BAND 36, HEFT 1 JULI 1959

PHYTOPATHOLOGISCHE ZEITSCHRIFT

Begründet von Prof. Dr. E. Schaffnit

Unter Mitwirkung von

Prof. Dr. E. Baldacci, Mailand / Prof. Dr. H. Braun, Bonn / Prof. Dr. W. B. Brierley, Keswick-Cumberland / Prof. Dr. T. Hemmi, Kyoto / Prof. Dr. N. Hiratsuka, Tokyo
Oberreg.-Rat i. R. Dr. E. Köhler, Braunschweig / Prof. Dr. K. O. Müller, Heidelberg
Prof. Dr. H. M. Quanjer, Wageningen / Prof. Dr. T. S. Sadasivan, Madras
Prof. Dr. Tr. Savulescu, Bukarest / Prof. Dr. K. Silberschmidt, São Paulo
Prof. Dr. E. C. Stakman, St. Paul

herausgegeben von den Professoren

E. Gäumann Zürich
M. Klinkowski Aschersleben
H. Richter Berlin-Dahlem

Mit 44 Abbildungen

1959
PAUL PAREY IN BERLIN UND HAMBURG

Phytopath. Z. Bd. 36 Heft 1 S. 1—100 Berlin 1959

Postverlagsort Berlin

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL
5 AUG 1959

INHALT

Abhandlungen

GÄUMANN, E., und H. KERN, Über chemische Abwehrreaktionen bei Orchideen. Mit 4 Abb. 1

HÄRRI, E., Physiologische Untersuchungen über die Gattungen *Thielavia* Zopf und *Thielaviopsis* Went. Mit 16 Abb. 27

SCHÄLLER, G., Untersuchungen über die Gallbildung und Nekrosereaktion der Rebensorten unter Berücksichtigung der Rassendifferenzierung der Reblaus. Mit 10 Abb. 67

ŠUTIĆ D., Die Rolle des Paprikasamens bei der Virusübertragung. Mit 5 Abb. 84

GUPTA, S. C., and K. S. BHARGAVA, *Erysiphe polygoni* DC. on *Homalocladium platycladum* from India. With 7 figures 94

Kurze Mitteilungen

SCHMELZER, K., und H. O. SCHMIDT, Die Gelbnetzkrankheit der Forsythie. Mit 2 Abb. 97

Besprechungen 100

Manuskripte: In deutscher, englischer, französischer oder italienischer Sprache abgefaßte Originalarbeiten werden druckfertig und möglichst in Schreibmaschinenschrift erbeten. Aufnahme von Tabellen und Abbildungen unterliegt jeweils vorheriger Vereinbarung.
„Kurze Mitteilungen" sind solche Veröffentlichungen in den vorerwähnten Sprachen, die im allgemeinen einen Umfang von vier Druckseiten nicht übersteigen. Sie erscheinen möglichst schon im nächsten Heft.
Die „Besprechungen" erscheinen nur in deutscher Sprache.

Herausgeber: Prof. Dr. E. GÄUMANN, Zürich 6, Universitätsstraße 2, Prof. Dr. M. KLINKOWSKI, Aschersleben, Ermslebener Str. 52, und Prof. Dr. H. RICHTER, Berlin-Dahlem, Königin-Luise-Str. 19. Zusendung der Manuskripte von Originalarbeiten und „Kurzen Mitteilungen" entweder an den Verlag Paul Parey, Berlin SW 61, Lindenstraße 44/47, oder an einen der drei Herausgeber.
Zusendung der „Besprechungen" unmittelbar an Prof. RICHTER, Berlin-Dahlem. Soweit nicht eine Aufforderung der Herausgeber zur Besprechung bestimmter Arbeiten ergangen ist, empfiehlt es sich, Prof. RICHTER vorher von der Absicht der Besprechung zu verständigen.

Honorierung: Das Mitarbeiterhonorar für Originalarbeiten und „Kurze Mitteilungen" beträgt 32,— DM je Druckbogen von 16 Seiten. Bei Beiträgen von mehr als drei Bogen werden nur die ersten drei Bogen honoriert; Dissertationen und Buchbesprechungen sind honorarfrei.

Sonderdrucke: Jeder Mitarbeiter erhält unberechnet 30 Sonderdrucke seines Beitrages (Originalarbeiten und Kurze Mitteilungen). Mehrbedarf gegen Berechnung.

Vorbehalt aller Rechte, insbesondere auch der photomechanischen Vervielfältigung: Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdrucks und der photomechanischen Wiedergabe sind vorbehalten. Gewerblichen Unternehmen wird die Anfertigung einer photomechanischen Vervielfältigung von Beiträgen oder Beitragsteilen für den innerbetrieblichen Gebrauch durch Photokopie, Mikrokopie und dergleichen, nach Maßgabe des zwischen dem Börsenverein des Deutschen Buchhandels und dem Bundesverband der Deutschen Industrie abgeschlossenen Rahmenabkommens vom 14. 6. 1958, gegen Bezahlung der dort vorgesehenen Gebühr bis zu 3 Exemplaren gestattet. Die Vervielfältigungen haben einen Vermerk über die Quelle und den Vervielfältiger zu tragen. Die in dem Rahmenabkommen vorgesehene Gebühr ist an die Inkassostelle für Photogebühren beim Börsenverein des Deutschen Buchhandels e. V., Frankfurt/Main, Gr. Hirschgraben 17-19, zu entrichten. Erfolgt die Entrichtung der Gebühren durch Wertmarken der Inkassostelle, so ist für jedes Photokopierblatt eine Marke im Werte von DM 0,30 zu verwenden. Mit der Überlassung des Manuskriptes überträgt der Verfasser dem Verlag das Recht zu dieser Genehmigung.

Erscheinungsweise: Die Zeitschrift erscheint in zwangloser Folge. Jährlich erscheinen etwa 10—12 Hefte, von denen 4 einen Band bilden. Jeder Band enthält etwa 30 Druckbogen.

Bezugsbedingungen: Der Preis des Bandes richtet sich nach dem Umfang. Er beträgt je Druckbogen von 16 Seiten etwa 3,50 DM. Die Hefte sind auch einzeln käuflich. Das Abonnement verpflichtet zum Bezug eines ganzes Bandes. Es verlängert sich jeweils, falls nicht spätestens unverzüglich nach Eingang der letzten Lieferung des berechneten Bandes Abbestellung erfolgt.

Verlag: Paul Parey, Berlin SW 61, Lindenstraße 44/47, Telefon 61 44 68/69. Printed in Germany (Westberlin).

Abonnementspreis dieses Heftes 23,— DM **Einzelpreis 25,30 DM**

Aus dem Institut für spezielle Botanik
der Eidg. Technischen Hochschule in Zürich

Über chemische Abwehrreaktionen bei Orchideen[1])

Von

E. Gäumann und H. Kern[2])

Mit 4 Abbildungen

Inhalt: Einleitung. — 1. Kapitel. Der natürliche chemische Infektionsschutz der Knollen von *Orchis militaris*. — 2. Kapitel. Die im Verlauf der Infektion von *Orchis militaris* neu entstehenden Stoffe. — 3. Kapitel. Biologische Gegebenheiten über das Orchinol. — 4. Kapitel. Das Wirtsspektrum für die Bildung von Orchinol. — 5. Kapitel. Das Spektrum der antigenen Mikroorganismen. — 6. Kapitel. Das Wirkungsspektrum des Orchinols. — 7. Kapitel. Allgemeine Betrachtungen. — Zusammenfassung. — Summary. — Literaturverzeichnis.

Einleitung

Die Wurzeln mancher Orchideen werden regelmäßig von Mykorrhizenpilzen besiedelt, weit seltener dagegen (und auch dann nur in einem engen Bereiche) die Knollen. Beim Nichtbefall bzw. beim lokalisierten Befall der Knollen scheinen nach den bisherigen Untersuchungen eine praeinfektionelle und eine postinfektionelle Abwehrkomponente zusammenzuwirken; die erstere ist (falls sie wirklich besteht) unabhängig von irgendwelchen Infekten schon von Natur aus vorhanden; die letztere wird dagegen erst als Antwort auf einen Infekt neu gebildet.

a) Die praeinfektionelle Schutzkomponente. Die Knollen von *Loroglossum hircinum* (L.) Rich., *Orchis militaris* L. und *Orchis Morio* L. enthalten nach den Angaben der Literatur zuweilen schon im Erdboden bzw. schon im frisch gegrabenen Zustande einen Stoff, der den Mykorrhizenpilz *Rhizoctonia repens* Bern. zu hemmen vermag. Legt man nämlich

[1]) Die vorliegende Arbeit wurde durch den schweizerischen Nationalfonds zur Förderung wissenschaftlicher Forschung und durch den Zentenarfonds der Eidg. Technischen Hochschule unterstützt; wir möchten den zuständigen Behörden auch hier unseren Dank wiederholen.

[2]) Unter Mitwirkung von R. Bossi, R. Braun, H. R. Hohl, F. Humm, J. Nüesch, H. Schüepp, H. Siegle und Frau S. Weber.

Stücke von derartigen Knollen steril auf Agar und entfernt sie nach fünf Tagen, so kann es geschehen, daß ihre Auflagestelle auf dem Agar von der *Rhizoctonia repens* nicht mehr besiedelt wird. Die Natur dieses praeformierten Hemmstoffes ist nicht bekannt.

b) Die postinfektionelle Abwehrkomponente. Die nach den Angaben der Literatur in den Knollengeweben möglicherweise schon von Natur aus vorhandene chemische Schutzkomponente wird bei Infektion durch *Rhizoctonia repens* von einer echten, induzierten Abwehrreaktion überlagert. Legt man nämlich Knollenstücke der drei genannten Orchideen unter aseptischen Bedingungen 15 mm vor eine heranwachsende Kultur dieses Mykorrhizenpilzes, so werden seine Hyphen schon im Abstand von einigen Millimetern vor dem Knollenstück aufgehalten; somit ist aus den Knollen ein pilzwidriger Stoff in den Agar hinausdiffundiert. Nur lebende Knollen sind zu derartigen antiinfektionellen Abwehrreaktionen behähigt; tötet man die Knollen vor dem Versuch durch Kälte ab, so vermögen sie den Pilz nicht mehr fernzuhalten und werden von ihm überwachsen (BERNARD 1911, NOBÉCOURT 1923, 1928, MAGROU 1924, GÄUMANN und JAAG 1945, GÄUMANN, BRAUN und BAZZIGHER 1950, GÄUMANN 1951, S. 425—429).

Als ein Abwehrstoff, der unter der Einwirkung der *Rhizoctonia repens* in den Knollengeweben von *Orchis militaris* neu entsteht, wurde vor zwei Jahren das Orchinol mit der Bruttoformel $C_{16}H_{16}O_3$ erkannt, wahrscheinlich ein Kryptophenol, d. i. ein Phenol, dessen OH-Gruppe nicht in der üblichen Weise reagiert (BOLLER, CORRODI, GÄUMANN, HARDEGGER, KERN und WINTERHALTER 1957); dies ist der erste pflanzliche Antikörper, der kristallin dargestellt wurde.

In der vorliegenden Arbeit möchten wir mit der Klärung dieser komplexen Verhältnisse beginnen, und zwar zur Hauptsache an Hand der Knollen von *Orchis militaris*. Die Arbeitsmethoden für die Isolierung und den chemischen Nachweis des Orchinols wurden vor kurzem in dieser Zeitschrift gesondert dargestellt (GÄUMANN und KERN 1959).

1. KAPITEL

Der natürliche chemische Infektionsschutz der Knollen von *Orchis militaris*

Als „natürlich" oder „praeinfektionell" wird hier (im Sinne der Einleitung) jener Zustand der Orchideenknollen verstanden, den wir in nicht erkrankten und nicht kontaminierten Exemplaren beim Ausgraben aus dem Erdboden vorfinden; das Wort „praeinfektionell" steht somit im Gegensatz zu jenen Knollen, deren Infektabwehr durch die laboratoriumsmäßige Infektion mit dem Mykorrhizenpilz *Rhizoctonia repens* „künstlich" aktiviert worden ist.

Bei den Untersuchungen über den natürlichen chemischen Infektionsschutz der Knollen ist wichtig, daß die Knollen für jeden Versuch frisch ausgegraben und sogleich mit Propylenoxyd desinfiziert und für den Versuch aufgebraucht werden. Es geht somit nicht an, Knollen auf Vorrat zu graben

und sie beispielsweise im Kühlschrank bei + 2 °C aufzubewahren; denn beim Graben werden Wurzeln verletzt bzw. abgebrochen; von den Wunden her wachsen Bakterien oder Pilze trotz der niederen Lagerungstemperatur durch die Gefäßbündel in das Innere der Knollen und verfälschen das Bild.

Werden frisch gegrabene Knollen von *Orchis militaris*, die keine Schädigungen, insbesondere keine lokalen Infektionsstellen (erkennbar an der örtlichen Verfärbung der Gewebe) aufweisen, nach der in unserer früheren Arbeit beschriebenen Methode chemisch aufgearbeitet, so fällt nur eine der dort genannten Fraktionen regelmäßig an, nämlich das Cumarin; ferner ist es möglich, daß unter den chemisch noch nicht identifizierten oder nicht einheitlichen Produkten zuweilen die Fraktion L 100 in minimalen Spuren vorkommt.

Cumarin ($C_7H_6O_2$; Mol. gew. 146) ist nach der Bestimmung von Herrn Dr. H. Corrodi (Organisch-chemisches Institut unserer Hochschule, Abt. Prof. Dr. E. Hardegger) in frisch gegrabenen oder zwei Wochen gelagerten Knollen in der Größenordnung von etwa 0,05 bis 0,4 ‰, bezogen auf das Frischgewicht, vorhanden (Tab. 1).

Tabelle 1

Der Cumaringehalt der Knollen von *Orchis militaris*

Behandlung der Knollen	Aufgearbeitete Knollenmenge g	Cumaringehalt	
		in mg	in ‰ des Frischgewichtes
Direkt nach dem Ausgraben extrahiert	569	29	0,05
Während 14 Tagen bei 27 °C stehengelassen	1 085	61	0,06
Durch Infektion mit *Rhizoctonia repens* aktiviert	10 000	810	0,08
	9 580	935	0,10
	5 235	1 450	0,28
	9 900	4 100	0,41

Die Knollen von *Orchis militaris* enthalten rund 12 % Trockensubstanz, also rund 88 % Feuchtigkeit. Bei einem Cumaringehalt von 0,05 ‰, bezogen auf das Frischgewicht der Knollen, besaß somit das Cumarin im Zellsaft eine durchschnittliche Konzentration von etwa $4 \cdot 10^{-4}$ molar, bei einem Cumaringehalt von 0,4 ‰ eine durchschnittliche Konzentration von etwa $3 \cdot 10^{-3}$ molar.

Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die antibiotischen Eigenschaften des Cumarins im Filterscheibchentest. Auf eine dicke Schicht Malzagar in Petrischalen wurde eine dünne Schicht desselben Nährbodens ausgegossen, die eine Sporen- oder Zellsuspension des Testorganismus enthielt. Nach Inkubation während 1 bis 2 Tagen bei 24 °C wurde der Durchmesser der Hemmzone abgelesen.

Tabelle 2

Die antibiotische Wirkung einiger *Orchis*-Fraktionen im Plattentest

Durchmesser der Hemmzonen in mm. Sp = Spur. Durchmesser der Filterscheibchen 6 mm. Lösungsmittel: reines Aceton für Fraktion L 100 bzw. reines Äthanol für die übrigen Fraktionen. Substanzgehalt der Lösungen 5 ‰, entsprechend einer Konzentration von rund $3 \cdot 10^{-2}$ molar. Beide Lösungsmittel bewirken für sich allein keine Hemmung

Testorganismus	Cumarin	p-Hydroxy-benzyl-alkohol	L 87	L 100	Methanol-Eisessig Eluat
Bacillus subtilis Cohn	0	Sp	0	0	Sp
Staphylococcus aureus Rosenb.	0	0	0	0	0
Escherichia coli (Mig.) Cast.	0	0	0	0	Sp
Candida vulgaris auct.	0	0	0	0	0
Saccharomyces cerevisiae Hans.	0	0	0	0	0
Rhizoctonia repens Bern.	0	0	0	0	0
Fusarium lycopersici Sacc.	0	0	0	0	0
Botrytis allii Munn.	7—8	0	Sp	0	Sp
Botrytis cinerea Pers.	0	0	0	0	0
Coniothyrium diplodiella (Speg.) Sacc.	0	0	0	0	0
Alternaria tenuis auct.	9—10	0	Sp	0	0
Penicillium citrinum Thom	0	0	Sp?	0	Sp?
Aspergillus niger v. Tiegh.	0	0	7—8	0	8

Die in Tabelle 2 verwendete Cumarinkonzentration von $3 \cdot 10^{-2}$ molar liegt zehn- bis hundertmal höher als dem Cumaringehalt im Zellsaft der Knollen von *Orchis militaris* entspricht (Tab. 1); dennoch erwies sich die antibiotische Wirkung des Cumarins als gering. Von den Testorganismen sprechen in Tabelle 2 nur *Botrytis allii* und *Alternaria tenuis* auf die 5 ‰ Cumarin an; dagegen wird beispielsweise *Rhizoctonia repens*, auf die es hier ankommt, selbst durch diesen hohen Cumarinspiegel nicht gehemmt.

Das in den Knollen von *Orchis militaris* spontan vorhandene Cumarin mag also in gewissen Fällen gegen Cumarin-sensible Mikroorganismen eine kleine Hemmwirkung ausüben. Gesamthaft betrachtet ist jedoch diese Schutzwirkung unbedeutend.

Ebenfalls zu vernachlässigen ist nach Tabelle 2 die antibiotische Wirkung der chemisch nicht definierten Fraktion L 100, abgesehen davon, daß sie selbst in aktivierten Knollen nicht regelmäßig auftritt und auch dann nur in geringen Mengen (in der Größenordnung von 10 mg auf 1 kg Knollenfrischgewicht) anfällt.

Der natürliche chemische Infektionsschutz, gewissermaßen die „Grundimmunität" der Knollen von *Orchis militaris* ist somit gering. Dies muß überraschen; denn die Orchideenknollen sind (im Gegensatz beispielsweise zu Kartoffelknollen)

mechanisch nur wenig geschützt, nämlich im Falle von *Orchis militaris* nur durch eine (unter der einschichtigen Epidermis und der ebenfalls einschichtigen Hypodermis) gelegene einschichtige verkorkte Exodermis, die aber ihrerseits stets wieder von nichtsuberinisierten Durchlaßzellen unterbrochen wird. Wenn also die Knollen von *Orchis militaris* trotz dieses geringen mechanischen Infektionsschutzes im Freien nur selten faulen, so muß ihre Infektabwehr anderswo liegen.

2. KAPITEL

Die im Verlauf der Infektion von *Orchis militaris* neu entstehenden Stoffe

Zur Vermeidung von Mißverständnissen sei zunächst der Begriff der chemischen Abwehrreaktion, wie wir ihn in der vorliegenden Arbeit zu verwenden gedenken, kurz umschrieben. Wir werden im letzten Kapitel eingehender auf diese Definitionsfrage zurückkommen.

Abwehrreaktionen in dem hier vertretenen Sinne werden durch einen Erreger in Gang gesetzt und richten sich mehr oder weniger gezielt gegen diesen Erreger oder gegen den von ihm ausgelösten Infekt; sie verlaufen also nicht „nebenbei".

Zwei Beispiele von Reaktionen, die in unserem Sinne „nebenbei" verlaufen, mögen den Unterschied verdeutlichen. In manchen Cruciferen sind Senföle glykosidisch an Zucker gebunden. Bei Verwundung der Gewebe werden die Senfölglykoside mit den in anderen Zellen lokalisierten Glykosidasen zusammengebracht und von diesen gespalten, wodurch die antibiotisch wirksamen Senföle in Freiheit gelangen. In ähnlicher Weise wird das antibiotisch wirksame Allicin im Gewebebrei von *Allium sativum* und *Allium ursinum* enzymatisch freigesetzt.

In beiden Fällen sind zwar die Endprodukte der Reaktion, wie die von uns gesuchten Abwehrstoffe, antibiotisch wirksam; aber ihr Bildungsmechanismus wird nicht durch einen Erreger gesteuert, sondern die antibiotisch wirksamen Endprodukte entstehen ganz zufällig infolge einer Verschmierung der Wundflächen.

Echte chemische Abwehrreaktionen wurden von uns in den Knollen von *Orchis militaris* vor allem in zwei Richtungen gesucht, in der gesteigerten Bildung von Lysinen und in der Neubildung von fungistatischen Stoffen.

Für das Bestehen von Lysinen spricht die mikroskopische Beobachtung, daß manche Mykorrhizenpilze im Innern gewisser Wirtszellen „verdaut" werden; ferner stellte Burges (1939) fest, daß der Preßsaft aus Knollen von *Orchis incarnata* L. die Hyphen eines Mykorrhizenpilzes korrodiert.

Als ein Lysin, dessen Produktion durch den Infekt gesteigert werden könnte, käme beispielsweise die Chitinase in Betracht; denn die Zellwände der hier interessierenden Pilze enthalten Chitin. Durch die Arbeitsgruppe von Herrn Christian Stoll wurde deshalb in unserem Institut der Chiti-

nasegehalt nichtaktivierter und aktivierter Knollen von *Orchis militaris* miteinander verglichen, und zwar mit einer Methode, die Enzymmengen von 0,2 mg zu erfassen vermag. Doch war in den beiden Knollenproben keine Chitinase-Aktivität nachzuweisen.

Falls somit im Abwehrsektor eine infektbedingte Steigerung der enzymatischen Aktivität der Knollen von *Orchis militaris* erfolgt, so spielt sie sich wahrscheinlich nicht im Bereich der Chitinase ab.

Bei den fungistatischen Stoffen war vor allem an Verbindungen mit Eiweißcharakter oder dann an gänzlich neue Stoffe zu denken. Gewisse Besonderheiten der in der Einleitung beschriebenen Hemmhöfe auf Agar ließen vermuten, daß sie nicht in erster Linie durch Stoffe aus der Eiweißgruppe ausgelöst wurden. Wir legten deshalb das Schwergewicht unserer Arbeit zunächst auf die Fahndung nach neu entstehenden nichteiweißartigen fungistatischen Substanzen.

Werden Knollen von *Orchis militaris* durch Infektion mit *Rhizoctonia repens* aktiviert und nach der in unserer vorangehenden Mitteilung (GÄUMANN und KERN 1959) beschriebenen Methode chemisch aufgearbeitet, so fallen vier Substanzen an, die während der Aktivierung der Knollen neu entstanden sind, nämlich die Fraktionen L 83 und L 87, das Methanol-Eisessig-Eluat und das Orchinol.

Die antibiotische Wirkung der Fraktion L 83 (p-Hydroxybenzylalkohol, $C_7H_8O_2$, Mol.gew. 124) ist nach Tabelle 2 gering, und zwar gleichgültig, ob das natürliche Präparat (eben die Fraktion L 83) oder die synthetische Substanz geprüft wird. Einzig gegen *Bacillus subtilis* besteht möglicherweise ein minimaler, biologisch zu vernachlässigender Hemmeffekt.

Ebenfalls zu vernachlässigen ist die antibiotische Wirkung der chemisch noch nicht definierten Fraktion L 87 und des Methanol-Eisessig-Eluates. Nur gegen *Aspergillus niger* läßt sich in Tabelle 2 bei diesen zwei Präparaten eine bescheidene Hemmwirkung (0,5 bis 1 mm über den Rand des Filterscheibchens hinaus) erkennen.

Die einzige Substanz mit einer hinreichenden antibiotischen Wirksamkeit, die zur Zeit in reiner Form vorliegt, ist das Orchinol. Wir möchten deshalb in den drei nun folgenden Unterkapiteln der Frage nachgehen, ob wir das Orchinol auf Grund seiner Entstehungsgeschichte wirklich als einen der von uns gesuchten Antikörper ansprechen dürfen.

§ 1. Der Orchinolgehalt intakter Knollen von *Orchis militaris*

Versuchsfrage: Ist das Orchinol in den Knollen von *Orchis militaris* schon von Natur aus (also praeformiert) vorhanden?

Frisch gegrabene Knollen von *Orchis militaris* zeigen zuweilen schwarze Flecke, die von spontanen Freilandinfektionen (vorwiegend durch *Rhizoctonia repens*) herrühren. Diese schwarzen Flecke wurden vor der chemischen Aufarbeitung der Knollen sorgfältig weggeschnitten. Unter diesen Vor-

aussetzungen ist nach Tabelle 3 in den unmittelbar nach dem Graben extrahierten Knollen von *Orchis militaris* kein Orchinol vorhanden, obschon in drei Wiederholungen volle 2½ kg Material (also über 1000 Knollen) extrahiert wurden. Gesunde Knollen von *Orchis militaris* enthalten somit kein praeformiertes Orchinol. Auch die soeben erwähnten spontanen Infektionen vermögen noch nicht, über ihren unmittelbaren (und von uns weggeschnittenen) Wirkungsbereich hinaus, weitere Knollengewebe zu aktivieren.

Zu dem gleichen negativen Ergebnis wie diese makrochemischen Bestimmungen führt die mikrochemische Prüfung der Knollen. Da dieser negative Beweis gewissermaßen das experimentum crucis für unsere ganze Betrachtungsweise darstellt, schildern wir den Gang der Arbeit bis in die Einzelheiten, damit der Versuch jederzeit wiederholt werden kann.

Gesunde, frisch ausgegrabene Knollen von *Orchis militaris* (wenn möglich vor Neujahr gegraben, weil dann die Kontaminationen im Innern der Knollen seltener sind) werden mit Leitungswasser gewaschen und leicht abgetrocknet; ihre Oberfläche muß noch etwas feucht sein, damit sich das Desinfektionsgas in der Wasserschicht löst. Hierauf werden die Knollen in einem Null-Grad-Raum (in welchem die nun folgenden Arbeiten ausgeführt werden) in einen Glaszylinder auf ein Drahtgeflecht (Abb. 1, 1) gelegt, das ihre Berührung mit dem flüssigen Propylenoxyd verhindert. Ein kleines Maßgefäß (Abb. 1, 2), das so bemessen ist, daß auf einen Liter des Zylinderinhaltes 1 ml Propylenoxyd entfällt, wird mit Propylenoxyd gefüllt. Der Glaszylinder wird mit einem Wattebausch (Abb. 1, 3) und sodann mit einem eingeschliffenen Deckel verschlossen. Das Maßgefäß wird nunmehr durch Kippen ausgegossen, und der Glaszylinder wird während mindestens 12 Stunden bei Zimmertemperatur gehalten, wobei das Propylenoxyd verdampft. Hierauf wird der Glasdeckel entfernt, und das Gas diffundiert durch den Wattebausch, der seinerseits eine erneute Kontamination der Knollen verhindert.

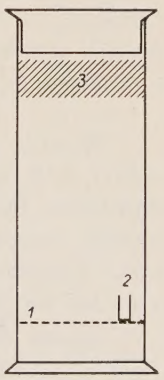

Abb. 1. Schema für die Desinfektion der Knollen. 1 Drahtgitter. 2 Maßgefäß für das Propylenoxyd. 3 Wattebausch. Erklärung im Text

In einem sterilen Impfkasten werden mit einer heißen Rasierklinge (heiß, damit keine Mikroorganismen längs der Schnittfläche verschleppt werden) die beiden Pole der Knollen weggeschnitten. Hierauf wird von der einen Schnittfläche her mit einem sterilen Korkbohrer aus der Längsachse der Knollen eine Walze von etwa 15 mm Durchmesser (je nach Größe der Knollen) und einem Gewicht von etwa 2 g herausgestochen; dabei muß allseitig ein mindestens 3 mm dicker Rand übrigbleiben, da die äußersten Knollenschichten zuweilen kontaminiert sind.

Um sicherzustellen, daß die Gewebe im Innern unserer Walzen wirklich steril sind, wurde jede Walze für sich in einen 100 ml Erlenmeyer, der mit 5 ml einer sterilen Nährlösung nach HELLER (1954) beschickt war, gelegt. Die Nährlösung enthielt im Liter 750 mg KCl, 600 mg $NaNO_3$, 250 mg $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$, 125 mg $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 75 mg $CaCl_2 \cdot 2\,H_2O$, 1 mg $FeCl_3 \cdot 6\,H_2O$, 1 mg $ZnSO_4 \cdot 7\,H_2O$, 1 mg H_3BO_3, 0,1 mg $MnSO_4 \cdot 4\,H_2O$, 0,03 mg $CuSO_4 \cdot 5\,H_2O$, 0,03 mg $AlCl_3$, 0,03 mg $NiCl_2 \cdot 6\,H_2O$, 0,01 mg KJ und als Kohlenstoffquelle 50 g Dextropur.

Die HELLERsche Nährlösung wurde für die hier zu besprechenden Hauptversuche deshalb gewählt, weil sie vollständig synthetisch ist, ferner weil sämtliche geprüften Pilze und Bakterien in ihr gut wachsen, und endlich weil sie (als Speziallösung für Gewebekulturen) für die Knollengewebe unschädlich ist. Die Menge der Nährlösung wurde auf 5 ml bemessen, damit die Walzen etwa 1 bis 2 mm tief in sie eintauchten.

Die Kölbchen wurden bei 27 °C auf einer Schüttelmaschine, die je Minute 4,5mal wippt, langsam bewegt, damit die Gewebewalzen dauernd und allseitig feucht blieben. Die Quarantäne in der Nährlösung dauerte je nach Versuch 2 bis 3 Wochen. Falls die Knollengewebe auch nur in Spuren kontaminiert oder infiziert waren, so kam dies im Verlauf von 2 bis 3 Wochen bei 27 °C zum Ausdruck, und die betreffenden Kölbchen wurden eliminiert. Die steril gebliebenen Walzen wurden jede für sich in der früher beschriebenen Weise aufgearbeitet und chromatographisch auf ihren Orchinolgehalt geprüft.

In den Kontrollen, die mit *Rhizoctonia repens* infiziert („aktiviert") worden waren, ließen sich stets mindesten 200 γ Orchinol nachweisen. In den sterilen Gewebewalzen konnten dagegen auch mit der UV-Methode, die 0,1 γ Orchinol zuverlässig anzeigt, nie irgendwelche Spuren von Orchinol festgestellt werden. Sterile Knollengewebe von *Orchis militaris* enthalten somit von Natur aus kein Orchinol.

Werden dagegen die Knollen von *Orchis militaris* unsachgemäß aufbewahrt, z. B. während 14 Tagen bei 27 °C gelagert, so können trotz der oberflächlichen Desinfektion Mikroorganismen, die latent in ihrem Innern vorhanden waren, z. B. *Rhizoctonia repens, Fusarium solani, Erwinia carotovora, Rhizobium* spec. und *Bacillus mesentericus,* sich spontan entwickeln und von den Gefäßbündeln aus die Gewebe angreifen.

Einige dieser Mikroorganismen, so *Rhizoctonia repens* und *Fusarium solani,* besitzen jedoch, wie wir später sehen werden, antigene Eigenschaften, d. h. sie besitzen die Fähigkeit, in den Knollen von *Orchis militaris* die Bildung von Orchinol auszulösen. Falls sich somit unter der spontanen Mikroflora der Knollen derartige antigene Mikroorganismen befinden, so können die betreffenden Knollen trotz aller oberflächlicher Desinfektion scheinbar schon „von Natur aus" beachtliche Orchinolgehalte aufweisen.

Derartige latente Infektionen haben zweifelsohne die Kontroverse ausgelöst, die seinerzeit zwischen NOBÉCOURT und MAGROU entstand. NOBÉCOURT (1923) hatte nämlich die Beobachtung von BERNARD (1911) bestätigt,

wonach die Orchideenknollen als Antwort auf eine Infektion durch einen Mykorrhizenpilz irgendeinen Abwehrstoff bilden und in den Nährboden hinaustreten lassen. Magrou (1924) erklärte jedoch diesen Hemmstoff als praeformiert; wenn er nämlich (wie wir in der Einleitung zu dieser Arbeit kurz referiert haben) Knollenstücke steril auf einen Nährboden legte und sie nach fünf Tagen entfernte, so wurde ihre Auflagestelle auf dem Nährboden zuweilen von der *Rhizoctonia repens* nicht mehr besiedelt.

Dieser Versuch ist nach unseren Erfahrungen dahin zu deuten, daß die von ihm verwendeten Knollen latent antigene Mikroorganismen enthielten, die sich unter der Einwirkung der aus dem Substrat heraufdiffundierenden Nährstoffe rasch entwickelten.

Tabelle 3

Der Orchinolgehalt verschieden behandelter Knollen von *Orchis militaris*

Behandlung der Knollen	Aufgearbeitete Knollenmenge g	Benzollöslicher Neutralteil bezogen auf Frischgewicht %	Orchinolgehalt bezogen auf Frischgewicht %	Orchinolgehalt Mutmaßliche Konzentration im Zellsaft in Molaritäten
Direkt extrahiert	1 000	1,8	0	—
	930	0,15	0	—
	570	1,0	0	—
Durch Infektion mit *Rhizoctonia repens* aktiviert	7 750	1,7	0,13	$0{,}6 \cdot 10^{-3}$
	9 580	2,4	0,14	$0{,}6 \cdot 10^{-3}$
	220	2,7	0,25	$1{,}1 \cdot 10^{-3}$
	8 276	2,9	0,25	$1{,}1 \cdot 10^{-3}$
	10 000	2,16	0,29	$1{,}3 \cdot 10^{-3}$
Abgetötet, dann beimpft				
Hitze (Autoklav)	330	3,0	0	—
Kälte (— 25 °C, 48 Std.)	425	—	0	—

§ 2. Der Orchinolgehalt aktivierter Knollen von *Orchis militaris*

Versuchsfrage: Entsteht in den mit *Rhizoctonia repens* laboratoriumsmäßig infizierten Knollen von *Orchis militaris* regelmäßig Orchinol?

Tabelle 3 und unsere sechzehnjährige Erfahrung bestätigen, daß Knollen von *Orchis militaris*, die nach der in unserer vorhergehenden Publikation beschriebenen Arbeitsmethode mit *Rhizoctonia repens* aktiviert wurden, in jedem Fall Orchinol enthalten. Nichtinfizierte Knollen von *Orchis militaris* enthalten somit regelmäßig kein Orchinol (§ 1), fachgemäß infizierte Knollen enthalten dagegen regelmäßig Orchinol. Das Orchinol ist somit wirklich ein induzierter Abwehrstoff, der von den Knollen von *Orchis militaris* regelmäßig als Antwort

auf eine Infektion mit *Rhizoctonia repens* neu gebildet wird.

Zum gleichen Ergebnis wie diese makrochemischen Untersuchungen führten die mikrochemischen Prüfungen der um die aktivierten Knollenfragmente sich bildenden Hemmhöfe. Unsere Arbeit ging ja von der eingangs geschilderten Beobachtung aus, daß Knollenfragmente bestimmter Orchideen auf Agar bestimmte heranwachsende Pilze aufhalten und auf diese Weise vor sich her oder um sich herum einen pilzfreien Hemmhof entstehen lassen (Photographien z. B. bei GÄUMANN 1951, Abb. 318 und 322). Falls das Orchinol wirklich einen der gesuchten Abwehrstoffe darstellt, so muß es in diesen Hemmhöfen vorhanden sein.

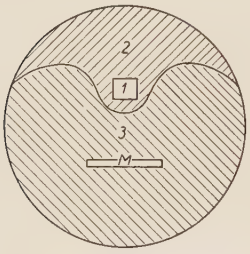

Abb. 2. Der Nachweis von Orchinol in den Hemmhöfen von *Orchis militaris*. Erklärung im Text. Rund 1/3 nat. Gr.

Myzelstreifen von *Rhizoctonia repens* oder von *Fusarium solani* (Abb. 2, M) wurden zum Anwachsen in eine Petrischale auf Agar gebracht. Nach drei Tagen wurde ein steriles Knollenstück von *Orchis militaris* (Abb. 2, 1) vor das heranwachsende Myzel gelegt. Nach weiteren fünf Tagen hatte sich ein Hemmhof gebildet, und der Versuch wurde in vier Fraktionen extrahiert, 1. das Knollenfragment selbst, 2. der vom Myzel abgewandte und von ihm nicht besiedelte Agar (Abb. 2, 2), 3. der vom Myzel überwachsene Agar mitsamt dem Myzel (Abb. 2, 3), und 4. der nicht verwendete Agarnährboden selbst.

Die papierchromatographische Prüfung der Extrakte ergab stets in der 1. Fraktion reichlich, in der 2. Fraktion weniger, in der 3. Fraktion noch etwas weniger und in der 4. Fraktion kein Orchinol. Der relativ geringere Orchinolgehalt der 3. Fraktion rührt offenbar daher, daß bei ihr ein großer orchinolfreier Agarballast (da ja das Orchinol in der Versuchszeit nicht durch die gesamte Petrischale diffundiert) mitverarbeitet werden mußte.

Ergebnis: Die *Orchis militaris*-Knollen enthalten nach § 1 von Natur aus kein Orchinol. Wird dagegen ein Knollenfragment der Einwirkung eines antigenen Pilzes ausgesetzt, so enthält es nach fünf Tagen reichlich Orchinol (1. Fraktion), und dieses Orchinol ist sowohl auf der dem Pilze abgewandten Seite (2. Fraktion) als auf der dem Pilze zugewandten Seite (3. Fraktion) in den Agar hinaus diffundiert. Das Orchinol stellt also wirklich ein induziertes Antibioticum dar, das von den *Orchis militaris*-Knollen als Antwort auf einen herannahenden antigenen Erreger neu gebildet wird und dem Erreger entgegendiffundiert.

§ 3. Wird das Orchinol vom Erreger oder vom Wirt gebildet?

Es wäre denkbar, daß das Orchinol in den Knollen von *Orchis militaris* ohne Hinzutun der Knollengewebe (also von ihnen aus gesehen rein pas-

siv) durch einen von der *Rhizoctonia repens* gesteuerten fermentativen Prozeß gebildet oder freigelegt wird; in diesem Falle würde die *Rhizoctonia repens* in den Knollengeweben eine ähnliche Rolle spielen wie die Hefen bei der alkoholischen Gärung überreifer Trauben.

Um diese Möglichkeit auszuschalten, wurde in Tabelle 3 der eine Knollenansatz der 3. Versuchsgruppe durch Hitze (20′ im Autoklaven), der andere durch Kälte (48 Stunden bei — 25 °C) abgetötet; die Kältebehandlung darf als die chemisch schonendste Tötungsart der Knollen betrachtet werden. Hernach wurden die Knollenfragmente in der üblichen Weise mit *Rhizoctonia repens* beimpft, wobei das Rhizoctoniamyzel ein außergewöhnlich üppiges Wachstum zeigte.

Beide Proben enthielten kein Orchinol (Tab. 3), also keinen Hemmstoff, was vielleicht das üppige Wachstum des *Rhizoctonia*-Myzels erklärt. Das Orchinol wird somit nicht von der *Rhizoctonia repens* aus Stoffen, die in den Knollen von *Orchis militaris* praeformiert vorhanden waren, gebildet oder freigelegt, sondern es wird von den l e b e n d e n Zellen der *Orchis militaris* selbst, u n d n u r v o n d i e s e n, als Antwort auf eine Infektion durch *Rhizoctonia repens* neu gebildet.

Aus den Ergebnissen dieser drei Unterkapitel möchten wir schließen, daß das Orchinol wirklich einen der gesuchten Antikörper der Knollen von *Orchis militaris* darstellt. Wir werden uns deshalb in den nun folgenden Kapiteln mit ihm beschäftigen.

3. KAPITEL

Biologische Gegebenheiten über das Orchinol

Im vorliegenden Kapitel werden uns die folgenden Fragen beschäftigen:

1. Wie gestalten sich die Löslichkeitsverhältnisse des Orchinols?

2. Welche Gewebe von *Orchis militaris* sind imstande, Orchinol zu synthetisieren? Und

3. Wie lange bleibt das Orchinol in den aktivierten Knollen von *Orchis militaris* nachweisbar?

Über einige weitere Fragen, so über die topographische Reichweite der Abwehrreaktion im Innern der Knollen und über den Rhythmus und das Ausmaß der Orchinolbildung in den Knollengeweben, werden wir in einer späteren Arbeit, wenn wieder neues Knollenmaterial zur Verfügung steht, berichten.

§ 1. Die Löslichkeitsverhältnisse des Orchinols

Das Orchinol ist lipophil und ist beispielsweise in Äthanol leicht, in Wasser dagegen wenig löslich. Wegen dieser geringen Wasserlöslichkeit diffundiert es auf Agarplatten im Filterscheibchentest nur schlecht und erzeugt

oft keine oder keine zuverlässigen Hemmhöfe. Bei seiner Austestung auf Agarplatten entstand deshalb die folgende Situation:

a) Aktivierte Knollen von *Orchis militaris* bilden auf Agarplatten schöne Hemmhöfe, in welchen das Orchinol papierchromatographisch nachgewiesen werden kann (Abb. 2).

b) Wird dagegen das Orchinol in alkoholischer Lösung auf Filterscheibchen gebracht und nach dem Trocknen auf eine Agarplatte gelegt, so diffundiert es launisch oder gar nicht.

Da die Wasserlöslichkeit mancher Phenole stark vom pH abhängt, wurde in einer ersten Versuchsreihe der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf das Lösungsverhalten des Orchinols in Wasser geprüft. Zwischen pH 2,2 und 8,0 wurden Citronensäure-Phosphat-Puffer nach McIlvaine verwendet, zwischen pH 9,0 und 11,5 Glycocoll-Puffer nach Sörensen. Das Orchinol wurde in alkoholischer Lösung im Überschuß zugegeben. Die quantitative Bestimmung des gelösten Orchinols erfolgte mit der UV-Fluoreszenz-Methode.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 3 dargestellt. Die kleine Unstimmigkeit zwischen pH 2,2 und 5,1 wurde, weil außerhalb der biologischen Wirklichkeit liegend, nicht näher verfolgt. Sieht man von ihr ab, so nimmt in Abbildung 3 die Löslichkeit des Orchinols mit steigendem pH zu, und zwar von rund 18 γ/ml bei pH 5,1 auf rund 77 γ/ml bei pH 11,5. Der Preßsaft aus Knollen von *Orchis militaris* besitzt ein pH von 6,0 bis 6,5. Eine gesättigte wässerige Lösung enthält bei diesem pH rund 22 γ Orchinol, entsprechend einer Konzentration von rund 10^{-4} molar.

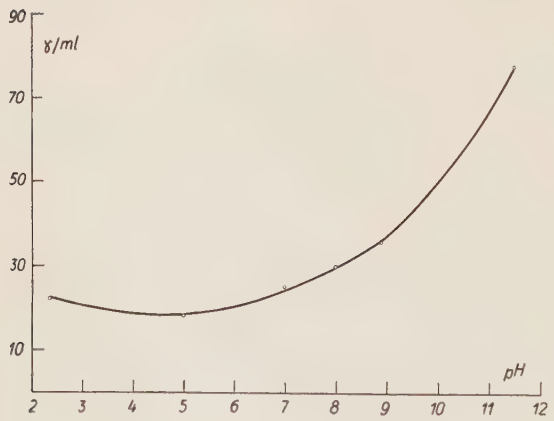

Abb. 3. Der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Löslichkeit des Orchinols in Wasser. Erklärung im Text

Eine derartige Konzentration ist jedoch rund zehnmal zu gering, als daß sie einen Hemmhof von dem Ausmaß, wie aktivierte Knollenfragmente ihn entstehen lassen, auszulösen vermöchte. Es wird deshalb zu prüfen sein, ob in den aktivierten Knollen von *Orchis militaris* ein Lösungsvermittler vorhanden ist; leider können wir dieser Frage erst später, wenn wieder neues Knollenmaterial zur Verfügung steht, nachgehen.

§ 2. Das Gewebespektrum für die Bildung von Orchinol

Versuchsfrage: Sind bei *Orchis militaris* außer den Knollen auch die Stengel und die Wurzeln imstande, Orchinol zu synthetisieren?

Das Chromatogramm von gesunden Stengeln und von frischen, nicht infizierten Wurzeln zeigt kein Orchinol an.

In spontan, d. h. schon in den Triebbeeten infizierten und erkrankten Geweben der Stengel und der Wurzeln von *Orchis militaris*, erkennbar an ihrer dunkelbraunen oder schwarzen Verfärbung, konnten dagegen regelmäßig die Fraktionen L 83 und L 87 und zu wiederholten Malen auch Orchinol nachgewiesen werden. Die Fähigkeit, als Antwort auf einen Infekt Orchinol zu bilden, ist somit bei *Orchis militaris* nicht auf die Knollen beschränkt, sondern sie erstreckt sich auch auf ihre Stengel und Wurzeln.

Leider ließ sich der Orchinolgehalt der infizierten Wurzelgewebe wegen der Schwierigkeit, einen zuverlässigen Bezugspunkt zu gewinnen, zahlenmäßig nicht mit der wünschbaren Genauigkeit bestimmen. Er beträgt aber nur Bruchteile von Gamma, auf jeden Fall weniger als 1 % des Orchinolgehaltes der infizierten Knollengewebe. Die Wurzeln von *Orchis militaris* sind somit an sich imstande, als Antwort auf eine Infektion mit *Rhizoctonia repens* Orchinol zu bilden; doch ist ihr Orchinolspiegel derart niedrig, daß er nicht ausreicht, um einen Befall durch *Rhizoctonia repens* zu verhindern.

§ 3. Die Dauer des induzierten Schutzes

Versuchsfrage: Wie lange bleibt das Orchinol in den aktivierten Knollen von *Orchis militaris* vorhanden?

Einige etwa 15 bis 18 Monate alte, aus dem Vorjahr stammende, völlig vermoderte Knollen von *Orchis militaris*, die schon seit Monaten abgestorben waren, wurden gelegentlich im Oktober auf p-Hydroxy-benzylalkohol, L 87 und Orchinol aufgearbeitet; sämtliche drei Stoffe waren reichlich in ihnen vorhanden; sie persistieren somit monatelang in den Knollengeweben, von denen sie gebildet wurden.

Die Knollen von *Orchis militaris* werden deshalb durch eine erste Infektion, die in ihnen die Bildung von Orchinol auslöste, monatelang gegen eine künftige Reinfektion geschützt; ihre chemische Abwehrreaktion führt dementsprechend zu einer erworbenen Immunität.

Immerhin pflegen in den Knollengeweben von *Orchis militaris* der p-Hydroxy-benzylalkohol- und der Orchinolspiegel im Laufe der Zeit allmählich zu sinken; so wurde in Abbildung 4 eine Probe von nicht völlig sterilen Knollenfragmenten mit *Rhizoctonia repens* superinfiziert und bei 24 °C inkubiert. Nach einem Höhepunkt am 18. Tage sank der Orchinolspiegel bis

zum 38. Tage auf rund die Hälfte, offenbar als Folge eines biologischen Abbaues durch die sich immer reichlicher entwickelnde Mikroflora.

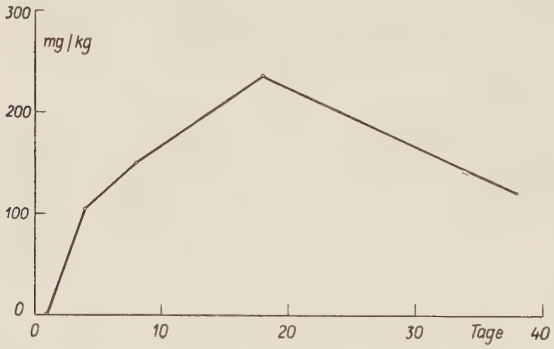

Abb. 4. Der Orchinolgehalt nicht völlig steriler Knollenfragmente von *Orchis militaris*, die mit *Rhizoctonia repens* superinfiziert worden waren. Abszisse: Versuchsdauer in Tagen. Ordinate: Orchinolgehalt in mg je kg Frischgewicht

Um zum mindesten über die Frage, ob *Rhizoctonia repens* selbst das Orchinol abzubauen vermag, einen ersten Anhaltspunkt zu gewinnen, wurden einige 100 ml Erlenmeyer mit je 5 ml der HELLERschen Nährlösung beschickt und mit je 1 mg p-Hydroxy-benzylalkohol bzw. 1 mg Orchinol in alkoholischer Lösung versehen; Infektion mit *Rhizoctonia repens;* Inkubation bei 27° C. Nach 20 Tagen waren beide Substanzen nur noch etwa zur Hälfte vorhanden; der Rest war offenbar von der *Rhizoctonia repens* ab- oder umgebaut worden.

Rhizoctonia repens ist somit imstande, p-Hydroxy-benzylalkohol und Orchinol chemisch ab- oder umzubauen. Ob und wie weit diese Fähigkeit im Infektionsgeschehen eine Rolle spielt, werden wir später, wenn neues Knollenmaterial zur Verfügung steht, abklären. Der vorliegende Versuch wurde ja unter Ernährungs- und Temperaturbedingungen, die für den Erreger optimal sind, durchgeführt. Im Innern der Orchideenknollen ist jedoch weder das eine noch das andere realisiert. Das Orchinol ist dort überdies dem unmittelbaren Zugriff des Pilzes entzogen, da es vor ihm her in den noch nicht infizierten Geweben gebildet wird.

4. KAPITEL

Das Wirtsspektrum für die Bildung von Orchinol

Versuchsfrage: Welche Orchideen sind imstande, als Antwort auf eine Infektion mit *Rhizoctonia repens* Orchinol zu bilden?

Rhizoctonia repens wurde als antigener Pilz gewählt, weil sie wenig wirtsspezifisch ist, vermag sie doch Vertreter von nicht weniger als vier Orchideentribus zu besiedeln (BURGEFF 1936, CURTIS 1939).

100 ml Erlenmeyer wurden mit je 5 ml der HELLERschen Nährlösung beschickt und mit *Rhizoctonia repens* infiziert. Nach drei Tagen wurde in drei- bis fünffacher Wiederholung je eine aseptisch gewonnene Gewebewalze aus den Knollen der in Tabelle 4 genannten Orchideen in eines der Kölbchen gelegt und nach der auf S. 8 beschriebenen Weise 12 bis 20 Tage (je nach Versuch) auf der Schüttelmaschine bei 27 °C inkubiert.

Tabelle 4

Die Bildung diimid-positiver Stoffe in den Knollen einiger Orchideen

Wirtsart	Orchinol	p-Hydroxy-benzylalkohol	Fraktion L 87
Aceras antropophora (L.) R. Br.	++	+	?
Anacamptis pyramidalis (L.) Rich.	++	++	?
Loroglossum hircinum (L.) Rich.	—	?	—
Loroglossum longibracteatum (Biv.) Moris *	+++	—	?
Orchis militaris L.	++	++	?
Orchis Morio L.	++	?	—
Orchis ustulata L.	—	?	?
Serapias neglecta Not.	++	++	+
Kartoffelknollen	—	—	—

* = *Barlia longibracteata* Parlat = *Aceras longibracteata* Rchbg. = *Orchis longibracteata* Biv.
— = nicht vorhanden.
\+ bedeutet im Falle des Orchinols rund 50 γ, ++ rund 100 γ, +++ rund 150 γ je g Frischgewicht.

Die papierchromatographische Aufarbeitung des Materiales ergab, daß sechs der acht geprüften Orchideen imstande sind, Orchinol zu bilden; die Fähigkeit zur Orchinolsynthese ist somit nicht artspezifisch auf *Orchis militaris* beschränkt, sondern sie besteht auch noch bei fünf anderen Orchideenarten. Bei fünf von diesen sechs Arten ist die unter unseren Versuchsbedingungen produzierte Orchinolmenge ungefähr gleich groß, nämlich rund 100 mg je kg Frischgewicht; bei einer Art, *Loroglossum longibracteatum*, ist sie dagegen um rund die Hälfte größer.

In systematischer Hinsicht sind wahrscheinlich fünf der sechs Orchinolbildner nahe miteinander verwandt; denn *Aceras*, *Anacamptis* und *Serapias* bastardieren mit *Orchis*. Dasselbe dürfte, entgegen den Auffassungen der heutigen Phanerogamensystematiker, für *Loroglossum longibracteatum* gelten, das reichlich Orchinol produziert und früher auf Grund morphologischer Erwägungen in die orchinolbildenden Gattungen *Aceras* bzw. *Orchis* gestellt wurde. Der Typus der Gattung *Loroglossum*, nämlich *Loroglossum hircinum* (L.) Rich., ist zur Orchinolbildung unfähig und somit im chemischen Gensektor anders struiert als *Loroglossum longibracteatum*. Vom „Orchinolstandpunkte" aus wäre es deshalb wohl richtiger, *Loroglossum longibracteatum* wieder in die Gattung *Aceras* bzw. *Orchis* zurückzuversetzen.

Die beiden Orchideen, die nach Tabelle 4 kein Orchinol synthetisieren, nämlich *Loroglossum hircinum* und *Orchis ustulata*, bilden trotz dieses Unvermögens typische Hemmhöfe gegen *Rhizoctonia repens*; ihre chemischen Abwehrreaktionen werden somit von anderen Stoffen als vom Orchinol getragen. Wir haben mit der Prüfung dieser Frage begonnen.

5. KAPITEL

Das Spektrum der antigenen Mikroorganismen

Versuchsfrage: Welche Mikroorganismen sind imstande, in den Knollen von *Orchis militaris* die Bildung von Orchinol auszulösen?

Leider konnten in diesem Sektor aus Mangel an Knollenmaterial erst einige Tastversuche ausgeführt werden. Die zu prüfenden Mikroorganismen wurden in HELLERscher Nährlösung kultiviert; dann wurde die Kulturflüssigkeit seitzfiltriert, 5-ml-weise in die auf S. 8 genannten Erlenmeyer gegeben, mit einer aseptisch gewonnenen Gewebewalze aus einer Knolle von *Orchis militaris* beschickt und 14 Tage auf der Schüttelmaschine bei 27 °C inkubiert; hernach wurden die Knollengewebe papierchromatographisch auf ihren Orchinolgehalt geprüft.

Didymella exitialis (Mor.) E. Müll., *Fusarium solani* (Mart.) App. et Wr., *Ophiobolus graminis* Sacc., *Orcheomyces hircini* Nobéc. und *Rhizoctonia repens Bern.* besitzen antigene Fähigkeiten, d. h. sie sind imstande, in den Knollengeweben von *Orchis militaris* die Synthese von Orchinol auszulösen; sie produzieren somit den Stoff oder die Stoffe, die den Mechanismus der Orchinolsynthese in Gang setzen.

Aspergillus niger v. Tiegh. und *Rhizoctonia solani* Kühn besitzen dagegen keine induzierende Wirkung. *Rhizoctonia solani* ist somit einerseits orchinolempfindlich und wurde (auch wegen ihrer Äthanoltoleranz) als Testorganismus bei der chemischen Isolierung des Orchinols verwendet, vermag aber anderseits in den Knollen von *Orchis militaris* die Orchinolsynthese nicht auszulösen.

Durch differentielle Aufarbeitung der Kulturfiltrate der antigenen und der nichtantigenen Organismengruppe wird es vielleicht gelingen, der chemischen Natur des Antigens oder der Antigene näherzukommen.

6. KAPITEL

Das Wirkungsspektrum des Orchinols

Das Wirkungsspektrum und die jeweiligen Wirkungsschwellen des Orchinols lassen sich, bis der Lösungsvermittler, von dem wir in § 1 des 3. Kapitels sprachen, bekannt ist, nicht mit der gewünschten Genauigkeit feststellen; denn wir müssen beim heutigen Stand unserer Kenntnisse — um ein Ausfallen des Orchinols zu verhindern — in höheren Konzentrationen den wässerigen Lösungen kleine Mengen Äthanol beigeben, die je nach der Äthanolempfindlichkeit der zu prüfenden Organismen das Bild trüben.

Auch der Weg, daß reihum die zu prüfenden Mikroorganismen im Plattentest einem Knollenfragment von *Orchis militaris* vorgesetzt werden und dann einen Hemmhof auslösen oder nicht, führt nicht zum Ziel; denn das Spektrum der orchinolsensibeln Mikroorganismen deckt sich, wie soeben

am Schluß des vorangehenden Kapitels im Zusammenhang mit *Rhizoctonia solani* angedeutet wurde, nicht mit dem Spektrum der antigenen Mikroorganismen.

Kursorische Tastversuche ergaben immerhin, daß unter den Bakterien z. B. *Bacillus subtilis* Cohn und *Staphylococcus aureus* Rosenb. durch Orchinol gehemmt werden, *Escherichia coli* (Mig.) Cast. dagegen nicht. Unter den Pilzen scheinen (neben *Rhizoctonia repens* und *Fusarium solani*) u. a. *Alternaria tenuis* auct., *Botrytis allii* Munn., *Botrytis cinerea* Pers. und *Coniothyrium diplodiella* (Speg.) Sacc. deutlich auf Orchinol anzusprechen.

Das Wirkungsspektrum des Orchinols ist somit verhältnismäßig weit und wenig spezifisch; die erste Infektion, welche die Bildung von Orchinol auslöste, schützte infolgedessen die Gewebe nicht nur gegen homologe Reinfektionen, sondern sie verschafft ihnen einen polyvalenten Schutz gegen eine ganze Reihe von Folgeparasiten und Saprophyten.

Diese geringe Spezifität teilt das Wirkungsspektrum des Orchinols mit dem Spektrum der orchinolbildenden Orchideenarten und mit dem Spektrum der die Orchinolsynthese auslösenden (antigenen) Mikroorganismen.

7. KAPITEL

Allgemeine Betrachtungen

Die Antikörper der Warmblüter und des Menschen, die durch Bordet, Pfeiffer, Ehrlich und viele andere erforscht wurden, gehören chemisch einer einheitlichen Stoffgruppe an, nämlich den Gamma-Globulinen und ihren unmittelbaren Verwandten; ferner besitzt der Mechanismus ihrer Bildung eine hohe Spezifität von Reiz und Reizantwort. Diese hohe Spezifität erstreckt sich auch auf ihre Leistung: Die klassischen Antikörper der Human- und Veterinärmedizin wirken eng gezielt gegen den sie auslösenden Erreger (bei antiinfektionellen Antikörpern) bzw. gegen das ihre Bildung auslösende Agens (bei antitoxischen Antikörpern).

Im folgenden seien einige Divergenzen, die zwischen dem Orchinol und den medizinischen Antikörpern bestehen, kurz besprochen.

§ 1. Die chemische Natur der Antikörper

Im Infektionsgeschehen der Pflanzen sind noch keine eiweißartigen Antikörper nachgewiesen worden, die den Gamma-Globulinen der Human- und Veterinärmedizin an die Seite gestellt werden könnten; dagegen werden derartige Stoffe von gewissen Blütenpflanzen in einem anderen Lebensbereich, nämlich zur Abwehr illegitimer Befruchtungen, gebildet; so treten im Leitgewebe der Griffel von *Oenothera*-Arten und von Petunien als Antwort auf eine „unerwünschte" Bestäubung durch einen inkompatibeln männlichen

Partner irgendwelche Glykoproteide (Kohlenhydrat-Eiweiß-Komplexe) neu auf, die das Wachstum des „unerwünschten" Pollenschlauches hemmen und dadurch das Zustandekommen einer „unerwünschten" Befruchtung verhindern (z. B. LEWIS 1952, LINSKENS 1957).

Wenn jedoch die weiblichen Organe der Blütenpflanzen zur Abwehr unerwünschter Lebewesen, im vorliegenden Falle unerwünschter Pollenschläuche, eiweißartige Antikörper bilden können, so werden sie es wahrscheinlich auch zur Abwehr unerwünschter Mikroorganismen tun, die durch die Narben einzudringen versuchen; vielleicht gehören die Abwehrreaktionen hierher, die in den Griffelgeweben von *Primula obconica* durch die Konidien von *Aspergillus luchuensis* (JUNG und STOLL 1957) ausgelöst werden.

Im Orchinol wird nunmehr ein pflanzlicher Antikörper aus einer völlig anderen Stoffgruppe nachgewiesen, nämlich aus der Gruppe der P h e n o l e. Man hat ja den Phenolen in der Pflanzenpathologie schon seit langem eine wichtige Bedeutung als Hemmstoffe gegen eindringende Erreger zugesprochen. Sie sind entweder von Natur aus in geeigneter Form und in hinreichender Konzentration in den Geweben vorhanden und wirken dann unmittelbar als solche; so beruht die Resistenz gewisser Gräser gegen *Phymatotrichum omnivorum* zum Teil auf ihrem Gehalt an pilzwidrigen Phenolen (GREATHOUSE und RIGLER 1940). In anderen Fällen wird die Tätigkeit des unspezifischen Polyphenol-Polyphenoloxydase-Systemes im Gefolge der Infektion gesteigert, wodurch in erhöhtem Maße pilzwidrige phenolische Oxydationsprodukte anfallen und den Erreger hemmen (z. B. CHRISTIANSEN-WENIGER 1956, FARKAS und KIRÁLY 1958, KIRÁLY 1959).

In allen diesen Beispielen handelt es sich um p r ä f o r m i e r t e Phenole bzw. um die gesteigerte Oxydation von solchen. Neu ist beim Orchinol, daß pflanzliche Gewebe als Antwort auf einen Infekt phenolische Substanzen sui generis n e u b i l d e n.

Die Reaktionsmöglichkeiten der Pflanzen sind somit bei der Infektabwehr breiter gespannt als im Tierreich. Der tierische Körper vermag als Antwort auf einen Infekt nur Vertreter einer einzigen Stoffgruppe, nämlich nur e i w e i ß a r t i g e Stoffe, neu zu synthetisieren, während die Pflanze in diesem Abwehrbereich überdies auch neuartige p h e n o l i s c h e Substanzen bilden kann.

§ 2. Die Spezifität von Reiz und Reizantwort

Bei der chemischen Infektabwehr der Warmblüter und des Menschen ist das Antigen in der Regel kompliziert gebaut; so besitzt das Diphtherietoxin A ein Molekulargewicht von rund 72 000. Entsprechend kompliziert und spezifisch gestaltet sich die Struktur der von ihm ausgelösten Antikörper. Im Falle des Orchinols liegen die Verhältnisse einfacher.

Die chemische Natur des A n t i g e n s, das in den Orchideenknollen die Bildung des Orchinols auslöst, ist zwar noch nicht bekannt; da jedoch verschiedenartige Pilze und Bakterien den Mechanismus der Orchinolsynthese in

Gang zu setzen vermögen, dürfte das Antigen kaum sehr kompliziert gebaut sein.

Freilich steht die Frage noch offen, wie unter diesen Voraussetzungen die Polyvalenz gewisser antigener Pilze zu deuten sei. Einige Pilze, unter ihnen *Rhizoctonia repens,* induzieren nämlich nicht nur in den Knollen von *Orchis militaris* usw. die Bildung von Orchinol, sondern sie vermögen überdies in den Knollen beispielsweise von *Loroglossum hircinum* einen anderen Abwehrmechanismus in Gang zu setzen, der nicht zur Orchinolsynthese führt; denn die Knollen von *Loroglossum hircinum* bilden kein Orchinol und hemmen *Rhizoctonia repens* doch; diese Hemmung muß somit durch einen andern (noch unbekannten) Abwehrstoff erfolgen, der bei einem unterschiedlichen chemischen Bau funktionell dieselbe Wirkung wie das Orchinol besitzt.

Si parva licet componere magnis, so könnte auch hier an das Diphtherietoxin als Parallele aus der medizinischen Immunitätslehre erinnert werden: es löst im Körper von Mensch, Affe, Rind, Schaf usw. chemisch verschieden gebaute Antikörper aus, die aber funktionell, nämlich in der Fähigkeit, das Diphtherietoxin zu neutralisieren, miteinander identisch sind.

Wenig differenziert als das Antigen ist im Falle des Orchinols auch die Reizantwort: Die Knollen von *Orchis militaris* vermögen ihre chemischen Abwehrreaktionen nicht, wie der Mensch, auf den jeweiligen Mikroorganismus abzustimmen, auf dessen Reiz sie antworten; sondern sie kennen nur das ja oder nein: entweder antworten sie oder sie antworten nicht; und wenn sie antworten, dann nur mit Orchinol, gleichgültig, welcher antigene Mikroorganismus die Antwort auslöste.

Dieser enge Rahmen der Antwort-Möglichkeiten hängt wohl zum Teil mit der einfachen chemischen Struktur des Antikörpers, eben des Orchinols, zusammen: Bei einem Molekulargewicht von 256 bestehen stereochemisch weniger Variationsmöglichkeiten als bei einem Molekulargewicht von 930 000 (Pneumokokken-Antikörper des Pferdes).

Der verhältnismäßig einfache Bau des Orchinols läßt es auch verstehen, daß sein Bildungsspektrum bloß gattungsspezifisch und nicht (wie bei den klassischen Antikörpern der Humanmedizin) artspezifisch ist: es wird nicht nur von *Orchis militaris* synthetisiert, sondern innerhalb der Gattung *Orchis* noch von mehreren anderen Arten, ferner von den der Gattung *Orchis* nahe stehenden und mit ihr Bastarde bildenden Gattungen *Aceras, Anacamptis* und *Serapias.*

Die gleiche geringe Differenziertheit wie beim chemischen Bau und beim Bildungsspektrum des Orchinols besteht auch für sein Wirkungsspektrum. Die klassischen Antikörper der Human- und Veterinärmedizin wirken scharf gezielt; und wenn sie polyvalent sind, so richtet sich ihre Polyvalenz höchstens gegen nahe verwandte Rassen oder Kleinarten eines Erregers. Das Orchinol wirkt dagegen in einem breiten Spektrum fungistatisch und bakteriostatisch, und innerhalb der Pilze und Bakterien gegen Vertreter aus verschiedenartigen Gruppen.

Diese geringe Spezifität des Wirkungsspektrums des Orchinols wird möglicherweise durch den (noch unbekannten) Mechanismus seiner antibiotischen Wirksamkeit bedingt. Es greift wahrscheinlich unmittelbar in einen unspezifischen Stoffwechselvorgang der betreffenden Mikroorganismen ein, während die kompliziert gebauten Eiweiß-Antikörper der Human- und Veterinärmedizin durch den Spiral- oder Gitterbau ihrer Peptide und durch ihre Aminosäuren-Seitenketten auch physikalisch-chemisch agieren und deshalb ihre Wirkung unendlich feiner zu differenzieren vermögen.

Das Orchinol steht somit hinsichtlich der Differenziertheit von Reiz und Reizantwort und hinsichtlich der Breite seines Wirkungsspektrums biologisch tiefer als die klassischen Antikörper der Warmblüter und des Menschen. Doch dürfte diese geringere Differenziertheit nicht generell für die chemische Infektabwehr der Pflanzen überhaupt gelten, sondern nur für die Besonderheiten des vorliegenden Beispieles; denn in anderen Sektoren des Infektionsgeschehens, so hinsichtlich der Organspezifität ihrer Erkrankungen (GÄUMANN 1951, S. 109—116) und hinsichtlich der Krankheitsanfälligkeit verschiedener Rassen („Sorten") eines Wirtes bzw. hinsichtlich der Schärfe der Wirtswahl der verschiedenen Rassen („Biotypen") eines Erregers (l. c., S. 264—272) sind die Blütenpflanzen viel feiner spezialisiert als die Warmblüter und der Mensch; entsprechend feiner werden in diesen Fällen auch Reiz und Reizantwort verzahnt sein.

§ 3. Die topographische Reichweite des induzierten Schutzes

Der Körper der Warmblüter und des Menschen kennt einerseits die lokale Immunität, bei der die induzierte Schutzwirkung auf bestimmte Gewebe beschränkt ist (z. B. die „Gewebeimmunität" im Sinne von BESREDKA und GRUMBACH; GÄUMANN 1951, S. 462) und anderseits die humorale Immunität, bei der das Antigen und insbesondere der Antikörper durch den Blut- und Lymphkreislauf über den gesamten Körper verfrachtet werden.

Wegen des Fehlens eines geschlossenen Zirkulationssystemes dürfte bei den Pflanzen die humorale Immunität von vornherein ausgeschlossen sein: Die Besonderheit ihres anatomischen Baues gestattet ihnen bloß die lokale, z. B. die Gewebeimmunität. Bei den Knollen von *Orchis militaris* wirkt dementsprechend der induzierte Schutz nur so weit, als Reiz und Reizantwort auf zellulärem Wege diffundieren. Ein lokaler bzw. lokalisierter Infektionsherd vermag deshalb bloß um sich herum eine Immunitätsbarriere, also eine Gewebeimmunität, zu schaffen, aber er vermag nicht die gesamte Pflanze zu feien.

Trotz ihrer beschränkten Ausdehnung ist jedoch die in den Knollen von *Orchis militaris* durch den Primärinfekt ausgelöste Immunitätsbarriere für die Knollen lebensentscheidend. Die Umwelt der Knollen, nämlich der Erdboden, ist ja mit Mikroorganismen stets überreichlich kontaminiert. Wenn somit ein spezialisierter Erreger wie *Rhizoctonia repens* in den Knollen einen Primärinfekt setzt, so würde dieser sogleich zu einer Eintrittspforte für alle möglichen unspezifischen Folgeparasiten, Fäulniserreger, Saprophyten usw. aus-

wachsen. In Wirklichkeit faulen aber die Knollen von *Orchis militaris* trotz ihres geringen mechanischen Schutzes und trotz der ständigen Infektionsgefahr nur selten; dies danken sie zweifelsohne der durch den Primärinfekt ausgelösten Immunitätsbarriere mit dem polyvalenten Orchinol als Träger der Infektabwehr.

§ 4. Die Dauer des induzierten Schutzes

Auf Grund der bisherigen Erfahrungen wurde angenommen, daß die pflanzliche Infektabwehr, wie die Abwehrreaktionen des Menschen gegen Tetanus und Tuberkulose, den Wirt nur gegen einen bestehenden Infekt schützen und nicht als Schutz gegen künftige Ansteckungen nachwirken; die Pflanzen kannten deshalb nach den bisherigen Auffassungen nur die infektionsgebundene Immunität (Prämunität; z. B. GÄUMANN 1951, S. 465).

Durch die Entdeckung des Orchinols wird diese Auffassung überholt. Das Orchinol persistiert ja monatelang in den Knollen von *Orchis militaris*, im extremen Falle bis an ihr Lebensende. Eine einmalige Abwehrreaktion der betroffenen Gewebe lokalisiert deshalb nicht nur den laufenden Infekt, sondern er wirkt nach und schützt die Gewebe auch gegen künftige Infektionen.

Die Pflanze kennt deshalb nunmehr neben der Prämunität auch die echte, durch eine Vorerkrankung erworbene und gegen künftige Ansteckungen schützende Immunität; in dieser Hinsicht ist sie also mutatis mutandis den Warmblütern und dem Menschen an die Seite zu stellen.

§ 5. Der Begriff des Antikörpers

Drei Merkmale sind für die biologische Deutung des Orchinols wesentlich:

a) es ist von Natur aus in den Geweben nicht vorhanden, sondern wird von ihnen erst als Antwort auf einen Infekt neu gebildet;
b) es wirkt toxisch (z. B. in niederen Konzentrationen wachstumshemmend, in höheren Konzentrationen letal) gegen den Erreger, der seine Bildung auslöste; und
c) es persistiert in den Geweben, von denen es gebildet wurde, und schützt sie monatelang gegen erneute Infektionen.

Das Orchinol erfüllt somit in funktioneller Hinsicht die Anforderungen, die an einen Antikörper gestellt werden dürfen; dagegen steht es hinter den klassischen Antikörpern der Human- und Veterinärmedizin in folgender Hinsicht graduell zurück:

a) es ist nicht ein Eiweiß, sondern ein chemisch einfach gebauter Körper;
b) die antigen wirkenden Mikroorganismen sind wenig spezifisch; verschiedene Pilze und Bakterien vermögen seine Bildung zu induzieren;
c) sein Bildungsspektrum ist ebenfalls nicht streng spezifisch; es kann von Vertretern aus mehreren (sich freilich systematisch sehr nahe stehenden) Orchideengattungen synthetisiert werden; und

d) auch sein Wirkungsspektrum ist nicht streng spezifisch; denn es wirkt antibiotisch gegen verschiedenartige Pilze und Bakterien.

Trotz dieser geringeren „biologischen Wertigkeit", verglichen mit den Gamma-Globulinen der höchsten Vertreter des Tierreiches, möchten wir das Orchinol auf Grund seiner Entstehungsgeschichte und seiner funktionellen Bedeutung als einen echten, induzierten Antikörper ansprechen. Der klassische medizinische Begriff des Antikörpers muß deshalb sinngemäß erweitert werden, indem man die Beschränkung auf eine bestimmte Stoffgruppe fallen läßt und den Nachdruck auf die Funktion des neu gebildeten Stoffes legt: Unter einem Antikörper im biologischen Sinne verstehen wir einen charakteristisch gebauten Abwehrstoff, der vom Wirt als Antwort auf einen Effekt neu gebildet wird und den Erreger, der seine Bildung auslöste, schädigt.

Zusammenfassung

Die Wurzeln mancher Orchideen werden regelmäßig von Mykorrhizenpilzen besiedelt, weit seltener dagegen (und auch dann nur in einem engen Bereich) die Knollen. Die Ursache liegt, wie an Hand der Knollen von *Orchis militaris* L. festgestellt wurde, bei chemischen Abwehrreaktionen, die in den Knollengeweben durch den Erreger ausgelöst werden.

Die Stoffe, die in den Knollen von *Orchis militaris* während der Infektion neu entstehen. In den Knollen von *Orchis militaris* werden während der Infektion durch *Rhizoctonia repens* p-Hydroxy-benzylalkohol ($C_7H_8O_2$; Mol.gew. 124) und Orchinol ($C_{16}H_{16}O_3$, Mol.gew. 256; Konstitution noch nicht völlig aufgeklärt, wahrscheinlich ein neuartiges Kryptophenol) regelmäßig neu gebildet. Die antibiotische Wirkung des p-Hydroxy-benzylalkohols ist gering; seine Bedeutung im Abwehrstoffwechsel der Orchisknollen (ob er z. B. einen Vorläufer des Orchinols darstellt) muß deshalb noch geklärt werden. Das Orchinol besitzt dagegen eine starke fungistatische Wirkung gegen *Rhizoctonia repens;* es stellt somit einen der gesuchten Antikörper dar.

Das Gewebespektrum für die Bildung von Orchinol. Bei *Orchis militaris* sind nicht nur die Knollen imstande, als Antwort auf einen Infekt Orchinol zu synthetisieren, sondern auch die Gewebe der Stengel und der Wurzeln. Der Orchinolgehalt der infizierten Wurzeln ist jedoch sehr niedrig, weniger als 1 % des Orchinolgehaltes der infizierten Knollengewebe; er genügt deshalb nicht, um die Wurzeln vor einer Infektion durch *Rhizoctonia repens* zu schützen.

Das Wirtsspektrum für die Bildung von Orchinol. Außer *Orchis militaris* sind auch *Aceras antropophora* (L.) R. Br., *Anacamptis pyramidalis* (L.) Rich., *Loroglossum longibracteatum* (Biv.) Moris, *Orchis Morio* L. und *Serapias neglecta* Not. imstande, als Antwort auf eine Infektion durch *Rhizoctonia repens* Orchinol zu synthetisieren, nicht aber *Orchis ustulata* L. und *Loroglossum hircinum* (L.) Rich. Da die Knollen dieser

beiden Orchideen trotz dieses Unvermögens typische Hemmhöfe gegen *Rhizoctonia repens* bilden, so werden ihre chemischen Abwehrreaktionen von anderen Stoffen als vom Orchinol getragen.

Das Spektrum der antigenen Mikroorganismen. Neben *Rhizoctonia repens* besitzen auch *Didymella exitialis* (Mor.) E. Müll., *Fusarium solani* (Mart.) App. et Wr., *Ophiobolus graminis* Sacc. und *Orcheomyces hircini* Nobéc. antigene Fähigkeiten, d. h. sie sind imstande, in den Knollengeweben von *Orchis militaris* die Synthese von Orchinol auszulösen; sie produzieren somit den Stoff oder die Stoffe, die den Mechanismus der Orchinolsynthese in Gang setzen. Hingegen besitzen z. B. *Aspergillus niger* v. Tiegh. und *Rhizoctonia solani* Kühn keine induzierende Wirkung. *Rhizoctonia solani* ist also einerseits Orchinol-empfindlich, vermag aber anderseits die Synthese von Orchinol nicht zu veranlassen.

Das Wirkungsspektrum des Orchinols. Unter den Bakterien werden z. B. *Bacillus subtilis* Cohn und *Staphylococcus aureus* Rosenb. durch Orchinol gehemmt, nicht aber *Escherichia coli* (Mig.) Cast. Unter den Pilzen sprechen z. B. *Alternaria tenuis* auct., *Botrytis allii* Munn., *Botrytis cinerea* Pers., *Coniothyrium diplodiella* (Speg.) Sacc., *Fusarium solani* (Mart.) App. et Wr. und *Rhizoctonia solani* Kühn deutlich auf Orchinol an. Das Wirkungsspektrum des Orchinols ist somit verhältnismäßig weit und wenig spezifisch; die erste Infektion, welche die Bildung von Orchinol auslöste, schützt infolgedessen die Gewebe nicht nur gegen homologe Reinfektionen, sondern sie verschafft ihnen einen polyvalenten Schutz gegen eine ganze Reihe von Folgeparasiten und Saprophyten.

Die Dauer des induzierten Schutzes. Das Orchinol persistiert monatelang in den induzierten Knollengeweben. Die Knollen werden deshalb durch eine erste Infektion, die in ihnen die Bildung von Orchinol auslöste, monatelang gegen eine erneute Infektion geschützt; ihre chemische Abwehrreaktion führt also zu einer erworbenen Immunität.

Allgemeine Betrachtungen. Nach der klassischen Definition der Human- und Veterinärmedizin wäre das Orchinol nicht als ein Antikörper anzusprechen; denn die Medizin kennt zur Zeit als Antikörper nur γ-Globuline und ihre unmittelbaren Verwandten und schränkt deshalb den Ausdruck „Antikörper" auf diese Stoffgruppe ein. Das Orchinol gehört chemisch einer anderen Stoffgruppe an; es ist viel einfacher gebaut und besitzt in jeder Beziehung eine geringere Spezifität. Trotz dieser geringeren „biologischen Wertigkeit", verglichen mit den γ-Globulinen der höchsten Vertreter des Tierreiches, möchten wir das Orchinol auf Grund seiner Entstehungsgeschichte und seiner funktionellen Bedeutung als einen echten, induzierten Antikörper ansprechen. Der klassische medizinische Begriff des Antikörpers muß deshalb sinngemäß erweitert werden, indem man die Beschränkung auf eine bestimmte Stoffgruppe fallen läßt und den Nachdruck auf die Funktion des neu gebildeten Stoffes legt: Unter einem Antikörper im biologischen Sinne verstehen wir einen charakteristisch gebauten Abwehrstoff, der vom Wirt als Antwort auf einen Infekt neu gebildet wird und den Erreger, der seine Bildung auslöste, schädigt.

Summary

Whereas the roots of many orchids are regularly invaded by mycorrhizal fungi, the bulbs rarely show such an association, and in these rare instances only limited areas are affected. The reasons for this are, as demonstrated by the bulbs of *Orchis militaris* L., the chemical resistance-reactions which are incited in the bulb tissues by certain microorganisms.

The substances which are synthesized in bulbs of *Orchis militaris* during infection: As a result of infections by *Rhizoctonia repens* Bern. the bulbs of *Orchis militaris* regularly form several substances. Among these are p-hydroxy-benzylalcohol ($C_7H_8O_2$; mol.wt. 124) and orchinol ($C_{16}H_{16}O_3$, mol.wt. 256; its structural formula is not yet fully apparent but is probably a cryptophenol of a new type). Both substances, which are reliably demonstrated at 0,1 γ by paper chromatography, are not evident even in traces in healthy bulbs. On the other hand, however, orchinol is present in infected orchid bulbs in the order of magnitude of 3 grams per kilogram of fresh weight. The antibiotic activity of p-hydroxy-benzylalcohol is slight and its role in the resistance-metabolism of the orchid bulb is not yet clear; however, it may be a precursor for orchinol. On the other hand, orchinol possesses a strong fungistatic activity against *Rhizoctonia repens* and is able to elicit in vitro the formation of a zone of inhibition of this fungus, similar to that formed by natural bulb fragments and consequently typifies the much sought antibody reaction.

The tissue spectrum for the formation of orchinol: Not only are the bulbs of *Orchis militaris* capable of responding to infection by producing orchinol, but the roots and stems as well are able to synthesize this substance. The orchinol content of infected roots is, however, very low; it is less than 1 % of the orchinol level of infected bulb tissues and, consequently, is not high enough to protect the roots from infection by *Rhizoctonia repens.*

The host spectrum for the formation of orchinol: In addition to *Orchis militaris, Aceras antropophora* (L.) R. Br., *Anacamptis pyramidalis* (L.) Rich., *Loroglossum longibracteatum* (Biv.) Moris, *Orchis Morio* L. and *Serapias neglecta* Not. are all able to answer an infection of *Rhizoctonia repens* by producing orchinol. However, *Orchis ustulata* L. and *Loroglossum hircinum* (L.) Rich. are unable to synthesize this compound. Despite this inability, these two orchid species produce, in vitro, typical zones of inhibition against *Rhizoctonia repens*, and thus their particular chemical resistance-reactions are based on substances other than orchinol.

The spectrum of the antigen-producing microorganisms: In addition to *Rhizoctonia repens, Didymella exitialis* (Mor.) E. Müll., *Fusarium solani* (Mart.) App. et Wr., *Ophiobolus graminis* Sacc. and *Orcheomyces hircini* Nobéc. are able to induce bulb tissue of *Orchis militaris* to synthesize orchinol. They produce, therefore, the substance or substances which set into motion the mechanism of orchinol synthesis. *Aspergillus niger* v. Tiegh. and *Rhizoctonia solani* Kühn do not possess an in-

duction activity. *Rhizoctonia solani* is thus orchinol-sensitive and unable to induce its synthesis.

The activity spectrum of orchinol: Among the bacteria *Bacillus subtilis* Cohn and *Staphylococcus aureus* Rosenb. are inhibited by orchinol whereas *Escherichia coli* (Mig.) Cast. is not. Of the fungi, *Alternaria tenuis* auct., *Botrytis allii* Munn., *Botrytis cinerea* Pers., *Coniothyrium diplodiella* (Speg.) Sacc., *Fusarium solani* (Mart.) App. et Wr. and *Rhizoctonia solani* Kühn react clearly to orchinol. The activity spectrum of orchinol is, therefore, relatively wide and little specific. The first infection which initiates the production of orchinol, consequently, protects the tissue not only against homologous reinfections but also produces a polyvalent protection against a whole series of secondary parasites and saprophytes.

The duration of the induced protection: Orchinol persists for months in the infected bulb tissues. Thus, those in which the production of orchinol is induced as a result of an initial infection, are protected for months against further new infections. Their chemical resistance-reaction leads, therefore, to an acquired immunity.

General considerations: In the sense of the classical definition of human and veterinary medicine orchinol cannot be classed as an antibody; for medicine currently recognizes only γ-globulins and their immediate relatives as antibodies and limits, therefore, the expression "antibody" to this particular group of substances. Orchinol chemically belongs to another group of compounds; it is much less complex and possesses less specificity. Nevertheless, we would define orchinol, by reason of its method of production and functional importance, as a genuine induced antibody. To do so, the classical medical definition of antibodies must be broadened: we drop the restriction to a specific group of substances and instead put the emphasis on the function of the newly built substance. An antibody in the biological sense would, therefore, be defined as a characteristically built substance created by the host in reply to an infection which in turn acts against the pathogen which has initiated its elaboration.

Literaturverzeichnis

Bernard, N., 1911: Sur la fonction fongicide des bulbes d'Ophrydées. Ann. Sc. nat., Bot., **14**, 221—234.

Boller, A., H. Corrodi, E. Gäumann, E. Hardegger, H. Kern und N. Winterhalter-Wild, 1957: Über induzierte Abwehrstoffe bei Orchideen I. Helv. Chim. Acta **40**, 1062—1066.

Burgeff, H., 1936: Samenkeimung der Orchideen. G. Fischer, Jena, 312 S.

Burges, A., 1939: The defensive mechanism in orchid Mycorrhiza. New Phytologist **38**, 273—283.

Christiansen-Weniger, E., 1956: Versuche zur stoffwechselphysiologischen Beeinflussung der Reaktion der Kartoffelknolle auf *Phytophthora infestans* de By. Phytopath. Z. **25**, 153—180.

Curtis, J. T., 1939: The relation of specificity of orchid mycorrhizal fungi to the problem of symbiosis. Amer. J. Bot. **26**, 390—399.

Farkas, G. L., and Z. Király, 1958: Enzymological aspects of plant diseases. Phytopath. Z. **31**, 251—272.

Gäumann, E., 1951: Pflanzliche Infektionslehre. 2. Aufl. Birkhäuser, Basel, 681 S.

— —, R. Braun und G. Bazzigher, 1950: Über induzierte Abwehrreaktionen bei Orchideen. Phytopath. Z. **17**, 36—62.

— —, und O. Jaag, 1945: Über induzierte Abwehrreaktionen bei Pflanzen. Experientia **1**, 21—22.

— —, und H. Kern, 1959: Über die Isolierung und den chemischen Nachweis des Orchinols. Phytopath. Z. **35**, 347—356.

Greathouse, Gl. A., and N. E. Rigler, 1940: The chemistry of resistance of plants to *Phymatotrichum* root rot. Amer. J. Bot. **27**, 99—108.

Heller, R., 1954: Les besoins minéraux des tissues en culture. Ann. Biol. **30**, 261—279.

Jung, J., und Chr. Stoll, 1957: Über die Hemmwirkung des Gynäzeums bei *Primula obconica* auf Bakterien und Pilze. Phytopath. Z. **31**, 180—184.

Király, Z., 1959: On the role of phenoloxidase activity in the hypersensitive reaction of wheat varieties infected with stem rust. l. c., **35**, 23—26.

Lewis, D., 1952: Serological reactions of pollen incompatibility substances. Proc. R. Soc., London, **B 140**, 127—135.

Linskens, H. F., 1957: Die Abwehr-Reaktionen der Pflanzen. Nijmegen-Utrecht, 1—20.

Magrou, J., 1924: A propos du pouvoir fongicide des tubercules d'Ophrydées. Ann. Sc. nat. Bot., 10 sér., **6**, 265—270.

Nobécourt, P., 1923: Sur la production d'anticorps par les tubercules des Ophrydées. C. r. Acad. Sc. Paris **177**, 1055—1057.

— —, 1928: Contribution à l'étude de l'immunité chez les végétaux. 2me édit. Tunis, 176 p.

Aus dem Institut für spezielle Botanik
der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich
Direktor: Prof. Dr. E. Gäumann

Physiologische Untersuchungen über die Gattungen *Thielavia* Zopf und *Thielaviopsis* Went

Von

Eugen Härri

Mit 16 Abbildungen

Inhalt: Allgemeiner Teil: I. Einleitung und Problemstellung. — II. Nomenklatur und Geschichte der Gattungen *Thielavia* und *Thielaviopsis*. — Experimenteller Teil: 1. Kap. Material und Methoden; § 1 Pilzstämme, § 2 Impfmaterial und Nährmedien, § 3 Bestimmungsmethoden. — 2. Kap. Kulturbedingungen für *Thielavia;* § 1 Allgemeines, § 2 Temperatur, § 3 Wasserstoffionenkonzentration, § 4 Licht, § 5 Ernährung; a) Allgemeines über die Ernährung, b) Kohlenstoff-Quelle, c) Stickstoff-Quelle, d) Andere Nährstoffe. — 3. Kap. Biologisch aktive Stoffwechselprodukte von *Thielavia*; § 1 Allgemeines, § 2 Kulturbedingungen für die Bildung von biologisch aktivem Hemmstoff, § 3 Isolierung der aktiven Stoffe, § 4 Biologische Teste. — 4. Kap. Die Lebensgemeinschaft von *Thielavia* und *Thielaviopsis*; § 1 Mischkultur, § 2 Infektionsversuche. — Diskussion. — Zusammenfassung. — Summary. — Literaturverzeichnis.

ALLGEMEINER TEIL

I. Einleitung und Problemstellung

Thielavia und *Thielaviopsis* werden in der Literatur als bodenbewohnende Pilze im Zusammenhang mit der Wurzelfäule, Fußkrankheit oder Wurzelbräune vieler tropischer und subtropischer Pflanzen genannt. Noch vor wenigen Jahren verursachte diese Krankheit in der Schweiz Ausfälle in der Tabakernte bis zu 50 % (Huter 1954).

Die Wurzeln der erkrankten Pflanzen werden braun bis schwarz; die Blätter beginnen zu vergilben, verlieren ihre Turgeszenz und nekrotisieren schließlich.

Die Krankheit tritt bei Bodentemperaturen von 20 bis 23 °C stärker auf als in wärmeren Böden (Sattler 1936); nach Gäumann (1951) erreichen Resistenz und Immunität des Wirtes (Tabak) ihre volle Wirkungshöhe nur im Temperaturbereich des Wachstumsoptimums, der beim Tabak und den

meisten anderen Wirtspflanzen zwischen 26 ° und 32 °C liegt. Die Resistenz findet ihren histologischen Ausdruck in der Bildung des Wurzelperiderms, die Immunität in der Neuanlage später verkorkender Abwehrzonen, durch die bei günstigem Verlauf die Infektionsherde abgeriegelt werden. In beiden Fällen ähneln sich nicht nur die entstehenden Gewebe (Kork), sondern auch ihr Zustandekommen ist im gleichen Sinne temperaturabhängig: Kalte Böden begünstigen die Krankheit, höhere Temperaturen Resistenzfaktoren und Immunreaktionen.

Thielavia und *Thielaviopsis* treten an kranken Wurzeln meist vergesellschaftet auf; die Ansichten über die Zusammenhänge zwischen beiden und über ihre phytopathologische Bedeutung widersprechen sich jedoch oftmals. Das daraus abzuleitende erste Problem soll im folgenden Kapitel (Abschnitt II) von der geschichtlich-nomenklatorischen Seite und im experimentellen Teil auch mit Hilfe der Physiologie gelöst werden.

Obwohl zahlreiche phytopathologische und biologische Arbeiten über die Wurzelbräune erschienen sind (PETERS 1921, SATTLER 1936 u. a. m.), wurde, wenn auch oft unter falschem Namen, hauptsächlich die Gattung *Thielaviopsis* untersucht. Über die Physiologie von *Thielavia* ist hingegen sehr wenig bekannt. Wegen der Verwandtschaft dieser Gattung mit *Aspergillus* und *Penicillium*, die zu den physiologisch leistungsfähigsten Ascomyceten gehören, erschien es wünschenswert, die Kulturbedingungen für *Thielavia* zu klären (Kap. 2).

GÄUMANN (1951) ist der Ansicht, der Erreger der Wurzelfäule sei ein toxinbildender Parasit; beim Eindringen in das Rindengewebe lasse der Pilz seine Toxine vor sich her diffundieren. Deshalb sollte auch die Frage der Toxinbildung näher untersucht werden (Kap. 3).

II. Nomenklatur und Geschichte der Gattungen *Thielavia* und *Thielaviopsis*

Thielavia und *Thielaviopsis* kommen auf Pflanzenwurzeln nicht nur gemeinsam vor, sondern sie werden bisweilen miteinander verwechselt oder als verschiedene Stadien ein und desselben Entwicklungszyklus betrachtet. Sofern es sich jedoch um zwei Pilze handeln sollte, wäre noch zu klären, welcher von beiden der Krankheitserreger sei.

1. Nomenklatur

Thielavia Zopf

ZOPF (1876) beschrieb einen Ascomyceten auf Wurzeln von *Senecio elegans* als einzige Art einer neuen Gattung *Thielavia*. Als Epitheton für diese Typusart wählte er „*basicola* B. et Br.". BERKELEY und BROOME (1850) verstanden jedoch unter ihrer „*Torula basicola*" das Chlamydosporenstadium des später als *Thielaviopsis basicola* bekanntgewordenen Pilzes. Der Name *Thielavia basicola* Zopf (non *Torula basicola* B. et Br.) ist demnach gültig für die Ascomycetenspecies, die zudem Gattungstypus sein muß; *Torula basicola* B. et Br. darf nicht einbezogen werden (Code internat. Nom. Bot. 1956, Art. 59).

Thielaviopsis Went

Gattung und Typus: Went (1893) beschrieb die Gattung *Thielaviopsis* und ihre Typusart *Thielaviopsis ethacetica.* Von Höhnel (1904) erklärte *Sporochisma paradoxum* de Seynes (1886) als Synonym und führte folgerichtig die Kombination *Thielaviopsis paradoxa* (Seyn.) Höhn. für den Gattungstypus ein.

Die Hauptfruchtform dieses Pilzes ist inzwischen bekanntgeworden (Dade 1928): *Ceratocystis paradoxa* (Dade) Moreau (Moreau 1952). Synonyme: *Ceratostomella paradoxa* Dade (Dade l. c.) und *Ophiostoma paradoxum* Nannf. (Melin und Nannfeldt 1934).

Thielaviopsis basicola: Ferraris (1912) stellte die von Zopf (1876) und von ihm selbst als Nebenfruchtform von *Thielavia basicola* Zopf interpretierte *Torula basicola* B. et Br. zur Imperfektengattung *Thielaviopsis*, so daß der nomenklatorisch gültige Name der Art *Thielaviopsis basicola* (B. et Br.) Ferr. lautet. Darunter sind die von Berkeley und Broome (1850) erstmals gefundenen Chlamydosporen mit den von Zopf (1876) und Ferraris (1912) beschriebenen Endokonidien vereinigt.

In die Synonymieliste gehört der von Sorokin (1876) geschaffene Name *Helminthosporium fragile* für das Chlamydosporenstadium sowie das durch bloße Umstellung zustande gekommene Binomen *Clasterosporium fragile* (Sor.) Saccardo (1886).

Diese Imperfektenart hat also zwei Konidienformen. Eine Hauptfruchtform wurde bisher nicht nachgewiesen.

Die Nomenklatur der übrigen *Thielavia*- und *Thielaviopsis*-Arten ist, gemessen an *Thielavia basicola* und *Thielaviopsis basicola,* unkompliziert. Welche Namen als gültig betrachtet und daher akzeptiert worden sind, geht aus der folgenden Zusammenstellung hervor. Untersuchungen über die systematische Berechtigung dieser Namen wurden zwar nicht angestellt, doch erscheint die generische Zusammengehörigkeit der in dieser Arbeit berücksichtigten *Thielavia terricola, Thielavia Sepedonium* sowie von *Thielavia setosa* mit dem Gattungstypus *Thielavia basicola* als sicher (Doguet 1956).

Thielavia Zopf — Verhandl. Bot. Ver. Prov. Brandenburg, 101 (1876).
[vgl. Hedwigia **16**, 114 (1877)]
Gattungstypus: *Thielavia basicola* Zopf l. c. — non *Torula basicola* Berk et Br. Ann. Mag. Nat. Hist. II, **5**, 461 (1850).
Syn.: *Thielavia renominata* Paclt — Parasitica **7**, 110 (1951).
2. Art: *Thielavia terricola* (Gilm. et Abbott) Emmons — Bull. Torr. Bot. Club **57**, 124 (1930).
Syn.: *Coniothyrium terricola* Gilm. et Abbott — Iowa State Coll. J. Sci. **1**, 225—345 (1927).
3. Art: *Thielavia Sepedonium* Emmons — Bull. Torr. Bot. Club **59**, 417 (1932).
4. Art: *Thielavia setosa* Dade — Trans. Brit. Myc. Soc. **21**, 20 (1937).
Thielavia indica Chattopadhyay et Das Gypta — Trans. Brit. Myc. Soc. 40, 277. Nicht untersucht.
Thielavia bovina Scalia — Funghi della Sicilia orient., 28 (1900). Gehört nach Doguet (1956) nicht zu *Thielavia.*
Thielavia Soppittii Crossland — New and crit. Brit. fungi West Yorksh. 7 (1899). Ist nach Doguet (1956) eher eine *Melanospora.*

Thielaviopis Went — Mededeelingen Van Het Proefstation, West-Java, Kagog-Tegal, 4 (1893).
Gattungstypus: *Thielaviopsis paradoxa* (de Seyn.) v. Höhn. — Hedwigia **43**, 297 (1904).
Syn.: *Thielaviopsis ethaceticus* Went l. c.
Sporochisma paradoxa de Seyn. — Recherch. Veget. Inf. **3**, 30 (1886).
Chalara paradoxa Sacc. — Syll. F. **10**, 595 (1892).
2. Art: *Thielaviopsis basicola* (Berk. et Br.) Ferraris — Flora Ital. Crypt. **1**, 233 (1912).
Syn.: *Torula basicola* Berk. et Br. — Ann. Mag. Nat. Hist. II, **5**, 461 (1850).
Helminthosporium fragile Sorokin — Hedwigia **15**, 113 (1876).
Clasterosporium fragile Sacc. — Syll. F. **4**, 386 (1886).
Thielaviopsis podocarpi Petri — N. Giorn. Bot. Ital. **10**, 582 (1903). Nicht untersucht.
Thielaviopsis neocaledoniae Datant — Rev. gén. Bot. **57**, 176 (1950). Nach DADANT (1950) nicht sicher eine neue Art.

2. Geschichte

Seit ZOPF (1876) herrschte die Auffassung vor, *Thielavia basicola* Zopf (Ascomycet) und *Thielaviopsis basicola* (B. et Br.) Ferr. (Chlamydosporen und Endokonidien) seien zwei Fruktifikationsformen des gleichen Pilzes. Ähnliche Meinungen vertraten SORAUER (1895), CAPPELLUTI-ALTOMARE (1902), DUGGAR (1909), GILBERT (1909), FOËX (1910), REDDICK (1913), BRIERLEY (1915), JOHNSON (1916) u. a. m. THAXTER (1892), CLINTON (1906, 1908) und PETERS (1921) beobachteten jedoch in Kulturen oder an künstlich infizierten Pflanzen nie Hauptfruchtformen. Daraus entstanden Zweifel an der ontogenetischen Zusammengehörigkeit von *Thielavia basicola* Zopf und *Thielaviopsis basicola* (B. et Br.) Ferr.

MCCORMICK (1925) bewies auf Grund ausgedehnter Versuche, daß diese Zweifel zu Recht erhoben worden waren.

WAKEFIELD (1936) isolierte von Erbsenwurzeln *Thielaviopsis basicola* (B. et Br.) Ferr. und nicht, wie die Autorin ausdrücklich betont, *Thielavia basicola* Zopf.

LUCAS (1948) bewies nochmals auf Grund von Unterschieden in den Wachstumseigenschaften, daß *Thielavia basicola* Zopf und *Thielaviopsis basicola* (B. et Br.) Ferr. zwei verschiedene Pilze sind.

Zwischen *Thielavia basicola* Zopf und *Thielaviopsis basicola* (B. et Br.) Ferr. besteht demnach neben der engen ökologischen Beziehung keine nähere systematische Verwandtschaft. Aus diesem Grunde dürfen die beiden im Speziesnamen gleichlautenden Epitheta nebeneinander bestehen bleiben (Code intern. Nom. Bot. 1956, Art. 59), und der Vorschlag von PACLT (1951), *Thielavia basicola* in *Thielavia renominata* Paclt umzubenennen, ist gegenstandslos.

Die Tatsachen sind jedoch bis in die neuere Zeit nicht immer richtig aufgefaßt oder nicht eindeutig dargestellt worden. Meist wurde der Name „*Thielavia basicola*" einfach für den Erreger der Wurzelfäule benutzt, also für *Thielaviopsis basicola* (B. et Br.) Ferr.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für spezielle Botanik der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich ausgeführt.

Den Herren Prof. Dr. E. GÄUMANN und Dr. CH. STOLL möchte ich für ihre großzügige Hilfe und die Ermöglichung meiner Untersuchungen herzlich danken.

Mein Dank geht auch an die Direktion der Sandoz AG Basel, welche durch tatkräftige finanzielle Mittel die Ausführung dieser Arbeit unterstützte.

Zahlreichen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für spezielle Botanik, vor allem Herrn Dr. Löffler und Herrn Obergärtner Humm, danke ich für ihre Mithilfe.

EXPERIMENTELLER TEIL

Kapitel 1: Material und Methoden

§ 1 Pilzstämme

Zu Beginn unserer Untersuchungen standen aus der Mykothek des Institutes für spezielle Botanik der ETH die in Tabelle 1 aufgeführten Stämme zur Verfügung.

Tabelle 1
Pilzmaterial

Art	Stamm Nr. ETH	Provenienz
Thielavia basicola	M 3676	CBS Stamm Cain
Thielavia Sepedonium	M 3674	CBS Stamm CMI
Thielavia Sepedonium	M 3675	CBS Stamm Cain
Thielavia Sepedonium	M 3679	NRRL
Thielavia terricola	M 3653	Doguet, Caen
Thielavia terricola	M 3678	NRRL
Thielavia terricola	M 3693	CBS Stamm IFO
Thielavia sp.	M 3670	NRRL
Thielavia sp.	M 3671	NRRL
Thielavia sp.	M 3672	NRRL
Thielavia sp.	M 3677	NRRL
Thielaviopsis basicola	M 3673	CBS Stamm v. Holder
Thielaviopsis sp.	M 3622	Eidgen. Versuchsanstalt Wädenswil
Thielaviopsis sp.	M 3623	
Thielaviopsis sp.	M 3621	
Thielaviopsis sp.	M 3624	

Es bedeuten: CBS = Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn; NRRL = National Regional Research Laboratories, Peoria, Illinois, USA.

Nach den ersten Versuchen zur Abklärung der Kulturbedingungen fiel auf, daß Stämme der gleichen Art unterschiedliche Resultate ergaben (siehe Kap. 2). Daher wurden möglichst viele *Thielavia*- und *Thielaviopsis*-Stämme verschiedener Provenienzen in die Versuche einbezogen. Im Verlaufe unserer Arbeit in den Jahren 1957/58 erhielten wir nachträglich die in Tabelle 2 angeführten Stämme. Die Untersuchung der beiden Stämme *Thielavia basicola* M 2901 und M 2903 zeigte, daß sie mit *Thielaviopsis basicola* identisch sind.

Tabelle 2
Nachträglich erhaltenes Pilzmaterial

Art	Stamm Nr. ETH	Provenienz
Thielavia basicola	M 2891	Bot. Inst. d. Univ. Greifswald
Thielavia basicola	M 2903	Bot. Inst. d. Univ. Greifswald
Thielavia basicola	M 2901	Nagao Inst. Tokyo
Thielavia Sepedonium	M 2893	ATCC 9787
Thielavia Sepedonium	M 2894	ATCC 11 814
Thielavia Sepedonium	M 2907	CBS Stamm Emmons
Thielavia Sepedonium	M 2908	CBS Stamm CBS
Thielavia Sepedonium	M 2909	CBS Stamm White
Thielavia terricola	M 2892	ATCC
Thielavia terricola	M 2910	CBS Stamm Swart
Thielavia terricola	M 2912	CBS Stamm Dodge
Thielavia terricola	M 2913	CBS Stamm Emmons
Thielavia terricola	M 2914	CBS Stamm Kominami
*Thielavia setosa**)	M 2911	CBS
Thielaviopsis basicola	M 2895	ATCC 9853
Thielaviopsis basicola	M 2896	ATCC 9109
Thielaviopsis basicola	M 2897	CMI 36 482
Thielaviopsis basicola	M 2898	CMI 36 483
Thielaviopsis paradoxa	M 2902	Nagao Inst. Tokyo

Es bedeuten: ATCC = American Type Culture Collection, Washington, USA; CMI = Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, GB.

*) Stamm *Thielavia setosa* CBS ist eine Mischkultur mit *Aspergillus flavus* Lk. und deshalb für physiologische Untersuchungen nicht geeignet.

Die Wirtspflanze ist nur bei zwei *Thielaviopsis*-Stämmen der Eidgenössischen Versuchsanstalt Wädenswil bekannt.

§ 2 Impfmaterial und Nährmedien

Die Nährlösungen in unseren Experimenten wurden in den meisten Fällen mit Sporen-, Konidien- oder Myzelsuspensionen beimpft. Gutes Impfmaterial erhielten wir in 500-ml-Erlenmeyerkolben auf ungeschältem Saatreis. Für die *Thielavia*-Kulturen sterilisierten wir bei 1 atü während 20 Min. 10 g ungeschälten Reis zusammen mit 30 ml des Sporuliermediums nach THOM und RAPER (1945): 50 g Glukose, 0,560 g $(NH_4)_2HPO_4$, 0,144 g KH_2PO_4, 0,120 g $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$, 0,200 g Pepton „Ciba", 45 ml dunkles Bier (Spezial), dest. Wasser ad 1000 ml. Die Kulturen inkubierten wir bei 30 °C während 15 bis 20 Tagen. Die meisten *Thielavia*-Stämme hatten in dieser Zeit reichlich Ascosporen gebildet. *Thielaviopsis* zeigte auf dem erwähnten Sporuliermedium durchwegs schwaches Wachstum. Wir versuchten einige andere Nährlösungen und fanden, daß sich ein Zusatz von Knop-Hefeextrakt-Nährlösung (STOLL 1954) zu Reis für die Konidienbildung bei *Thielaviopsis* am besten eignet: 20 g Glukose, 1 g $Ca(NO_3)_2$, 0,250 g $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$, 0,250 g KH_2PO_4, 0,250 g KCl, 5 g Difco-Yeast-Extrakt und 2 Tropfen einer

0,05%igen Lösung von Ferrichlorid zu je 1000 ml Nährlösung. Je 500-ml-Erlenmeyerkolben wurden 30 ml dieser Nährlösung mit 10 g Reis im Autoklaven sterilisiert. Die Inkubation erfolgte bei 27 °C während 2 bis 3 Wochen. Die Kolben wurden stets mit Material von Schrägagarkulturen mit der Impfnadel (trocken) beimpft.

Zur Suspension der Ascosporen und Konidien verwendeten wir je Kolben 100 ml steriles Leitungswasser, dem wir 0,1 ‰ Natriumlaurylsulfonat beifügten, damit die Keime sich besser voneinander trennten.

Der Großteil der *Thielavia*-Versuche wurde mit einer leicht modifizierten Czapek-Nährlösung durchgeführt, in der wir das eher neutral wirkende K_2HPO_4 durch das mehr saure KH_2PO_4 ersetzten: 30 g Saccharose, 3,0 g $NaNO_3$, 1,0 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$, 0,5 g KCl, 0,1 g $FeSO_4 \cdot 7\,H_2O$ ad 1000 ml dest. Wasser. Das pH dieses Nährmediums schwankte zwischen 4,9 und 5,3. Hier keimten die Sporen bei 37 °C etwa 10 Stunden nach Beimpfung aus, und das Myzel entwickelte sich sehr rasch, so daß wir die Wasserstoffionenkonzentration nur in speziellen Versuchen auf einen gewünschten Wert einstellten (vgl. Kap. 2, § 3).

Wie bereits erwähnt, wuchsen die *Thielaviopsis*-Stämme auf Czapek-Nährlösung nur sehr spärlich oder gar nicht; der Grund liegt im Fehlen von organischem Stickstoff (vgl. Kap. 2, § 5 c). Wir verwendeten für diese Pilze daher meistens Knop-Hefeextrakt-Nährlösung, jedoch ohne Reis. Der pH-Wert lag im Bereich von 5,4 bis 5,7. Die Inkubation der *Thielaviopsis*-Kulturen erfolgte bei 27 °C.

§ 3 Bestimmungsmethoden

a) Myzelgewicht

Bei der Ermittlung der Myzelgewichte hat sich die von Stoll (1954) angewendete Methode bewährt

b) Zuckerbestimmung

Da Glukose gegenüber Saccharose als C-Quelle für *Thielavia* keinen Wachstumsunterschied hervorruft (vgl. Kap. 2, § 5), wurde für einen Zuckerabbauversuch wegen des einfacheren Nachweises der reduzierende Zucker verwendet. Die Bestimmung erfolgte kolorimetrisch nach Paech und Tracey (1955), etwas abgeändert nach Stoll (nicht publ.). Das Prinzip dieser Methode besteht darin, daß das lösliche, farblose Triphenyltetrazoliumion zu unlöslichem rotem Formazan reduziert wird. Als Reagenzien benötigen wir eine 1%ige wässerige Triphenyltetrazoliumchloridlösung (TTC), die wöchentlich erneuert werden muß, 0,5 n NaOH (p. a.), 0,55 n CH_3COOH (p. a.) und Isopropylalkohol puriss. dest. In ein bei 25 ml graduiertes Pyrexreagenzglas wird 1 ml einer Lösung, die 0,2 bis 2,0 mg Glukose enthält, pipettiert. Man fügt 2 ml dest. Wasser, 1 ml TTC-Reagens und 2 ml 0,5 n NaOH zu. Das Gemisch wird gut durchgeschüttelt und sofort während genau 3 Minuten in einem siedenden Wasserbade erhitzt. Nach Abkühlen unter flie-

ßendem kaltem Wasser werden 2 ml 0,55 n Essigsäure zugegeben, mit Isopropanol auf 25 ml angefüllt und der Inhalt kräftig durchmengt.

Im Spektralphotometer werden bei einer Wellenlänge von $\lambda = 400$ mμ und einer Schichtdicke von 1 cm die Extinktionswerte der Lösungen abgelesen. Als Nullwert dient eine gleiche, jedoch zuckerfreie Lösung. Auf Grund einer mit reinen Glukoselösungen erstellten Eichkurve können die absoluten Resultate ermittelt werden.

c) Nitratbestimmung

Die von STOLL (1954) aufgeführte Nitratbestimmungsmethode mit Phenoldisulfosäure wurde übernommen. Nach unseren Erfahrungen arbeitet die Methode exakt. Es muß jedoch beachtet werden, daß die Glasschalen mit dem Nitratlösung-KOH-H_2O_2-Gemisch nicht auf das kochende Wasserbad gestellt werden, da sonst Verluste durch Spritzer entstehen.

Die Extinktionswerte im Spektralphotometer wurden bei $\lambda = 360$ mμ abgelesen.

Kapitel 2: Kulturbedingungen für *Thielavia*

§ 1 Allgemeines

Als Kulturgefäße für *Thielavia*- und *Thielaviopsis*-Stämme dienten größtenteils 500-ml-Erlenmeyerkolben. Standkulturen erschienen geeigneter als Schüttelkulturen.

Thielavia wächst bei 27 °C und 30 °C in den ersten 3 bis 5 Tagen unter Ausbildung von schleimigen, submersen Myzelknäueln, dann bildet sich innerhalb von 2 bis 3 Tagen an der Oberfläche eine geschlossene Schicht von Luftmyzel. Sie ist bei den *Thielavia Sepedonium*-Stämmen leicht gelblich gefärbt, bleibt jedoch bei allen anderen Vertretern von *Thielavia* weiß.

Bei 27 °C wachsen *Thielaviopsis*-Standkulturen submers; vom 10. bis 14. Tage an erscheint an der Oberfläche Luftmyzel, das je nach Stamm schwarz, braun oder grau gefärbt sein kann.

In Schüttelkulturen (rotierend, 200 U./Min.) bildet *Thielavia* verschieden große Kügelchen mit Durchmessern bis zu einem Zentimeter. In *Thielaviopsis*-Kulturen auf der Schüttelmaschine entstehen keine Myzelkugeln.

Vielfach kultivieren wir unsere Pilze in Petrischalen mit Czapek- oder Knop-Hefeextrakt-Agar. Die Wachstumsgeschwindigkeit eines Pilzes ließ sich auf diese Art ohne großen Arbeitsaufwand kontrollieren.

Nachdem ein *Thielavia*-Stamm als biologisch aktiv erkannt worden war, versuchten wir, größere Mengen dieses Pilzes in Glaxo-Gefäßen und in 4-Liter-Schüttelgefäßen auf dem Schüttelturm zu züchten. In den mit je 500 ml Nährlösung beschickten Glaxo-Gefäßen wuchs der Pilz gut, bildete jedoch wenig Hemmstoff; in Glaxo-Gefäßen mit 1000 ml Nährlösung und in größeren Schüttelgefäßen blieb die Hemmstoffproduktion vollständig aus (siehe Kap. 3).

§ 2 Temperatur

Versuch Nr. 1: Welches sind die Temperaturkardinalpunkte für *Thielavia*?

In Petrischalen wurden je 17,5 ml Czapek-Agar (pH 5,2) gegossen und die Platten mit einem runden Filterpapier (Sihl-Blotting Löschkarton, 277 g je m²) von 6 mm Durchmesser, welches in eine Sporensuspension getaucht worden war, beimpft. Von 10 *Thielavia*-Stämmen wurden je 3 Platten bei Temperaturen zwischen 0 ° und 47 °C und Intervallen von 1 ° bis 5 °C (vgl. Tab. 3) während maximal 21 Tagen inkubiert.

Tabelle 3

Der Einfluß der Temperatur

auf die Wachstumsgeschwindigkeit von *Thielavia*-Stämmen, Kardinalpunkte

Temperatur-Stufe	Stämme									
	T.bas. M3676	*T. Sep.* M3674	*T. Sep.* M3675	*T. Sep.* M3679	*T. ter.* M3653	*T. ter.* M3678	*T. sp.* M3670	*T. sp.* M3671	*T. sp.* M3672	*T. sp.* M3677
9 °	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—
12 °	+	+	+	+	—	+	+	+	—	+
15 °	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18 °	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21 °	+	+	+	+	+	+	+	+	+	17
24 °	15	13	13	13	15	+	14	16	14	11
27 °	14	11	11	13	17	+	14	15	12	11
30 °	11	10	10	10	12	+	11	12	11	9
33 °	10	9	10	9	11	14	10	11	11	8
37 °	9	8	9	8	10	9	10	10	10	8
42 °	10	+	8	11	11	8	10	12	8	+
44 °	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
46 °	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
47 °	—	—	—	—	—	—	—	—	-	—
Wachstumsminimum	12°	12°	12°	12°	15°	15°	15°	12°	15°	12°
Wachstumsmaximum	46°	46°	46°	46°	46°	46°	46°	46°	46°	42°
Wachstumsoptimum	37°	37°	42°	37°	37°	37°	33–42°	37°	42°	33 37°

Es bedeuten: Zahlen = Anzahl Inkubationstage, bis das Pilzmyzel die ganze Agaroberfläche bedeckt hat (Durchmesser: 90 mm), — = kein Wachstum, + = Kolonie wächst langsam, bedeckt jedoch nach 20 Inkubationstagen nicht die ganze Agaroberfläche.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengestellt: Die optimale Wachstumstemperatur liegt für die 10 untersuchten *Thielavia*-Stämme zwischen 33 ° und 42 ° C. Das erstaunlich hohe Temperaturmaximum von 9 Stämmen bei 46 °C fällt auf. Der unbestimmte *Thielavia*-Stamm M 3677 wächst nur noch bei 42 °C. Die niedrigste Wachstumstemperatur schwankt zwischen 12 ° und 15 ° C.

In Übereinstimmung mit Lucas (1955) fanden wir bei 4 *Thielaviopsis*-Stämmen ein Temperaturoptimum um 26 °C; bei 37 °C wuchsen diese Pilze nicht mehr.

Das Temperaturoptimum von *Thielavia* liegt also in einem Bereich, in dem *Thielaviopsis* überhaupt nicht mehr wächst. Diese Tatsache gibt uns die

Möglichkeit, mit Hilfe der Temperaturabstufung *Thielavia* von *Thielaviopsis* zu differenzieren (vgl. LUCAS 1948).

Nach HOPKINS (1956) und anderen Autoren entwickelt sich die Wurzelfäule des Tabaks am besten zwischen 16 ° und 24 °C; bei 27 °C und höheren Bodentemperaturen kommt keine Infektion zustande, selbst nicht in stark infizierter Erde, da der Pilz infolge zu hoher Temperaturen nicht mehr gut wachsen kann.

Die einzelnen *Thielavia*-Stämme zeigen außer Stamm M 3678 (*Thielavia terricola*) keine wesentlichen Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit bei den verschiedenen Temperaturen.

Eigenartigerweise ist die Wachstumsgeschwindigkeit von *Thielavia terricola* (M 3678) bei 27 °C geringer als bei 24 °C und, vom 15. Tage an, auch bei 21 °C. Von 30 °C an nimmt die Geschwindigkeit zu, und bei 42 °C ist sie am höchsten (vgl. Abb. 1).

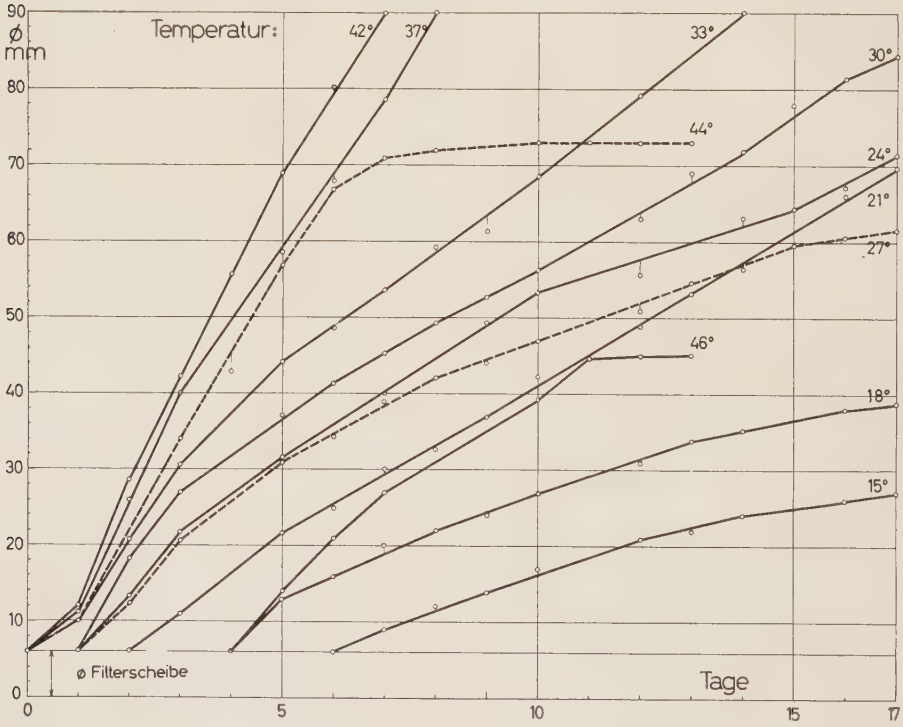

Abb. 1. Wachstum von *Thielavia terricola* (M 3678) bei verschiedenen Temperaturen

Wie wir im Kapitel 3 sehen werden, bildet dieser Stamm nur bei 27 °C und höheren Temperaturen ein biologisch aktives Stoffwechselprodukt. Die biologische Aktivität ist anscheinend nicht mit der Wachstumsgeschwindigkeit korreliert.

In Abbildung 2 sind die Myzelgewichte von Stamm M 3678 nach 47 Tagen Inkubation bei verschiedenen Temperaturstufen und mit unterschiedlichen Saccharosegehalten in Czapek-Nährlösung aufgezeichnet.

Mit steigender Temperatur und zunehmendem Zuckergehalt bis 10 % erhöht sich das durchschnittliche Myzelgewicht je 500-ml-Kolben bis zu einem Maximum von 1575 mg bei 44 °C mit 10 % Saccharose.

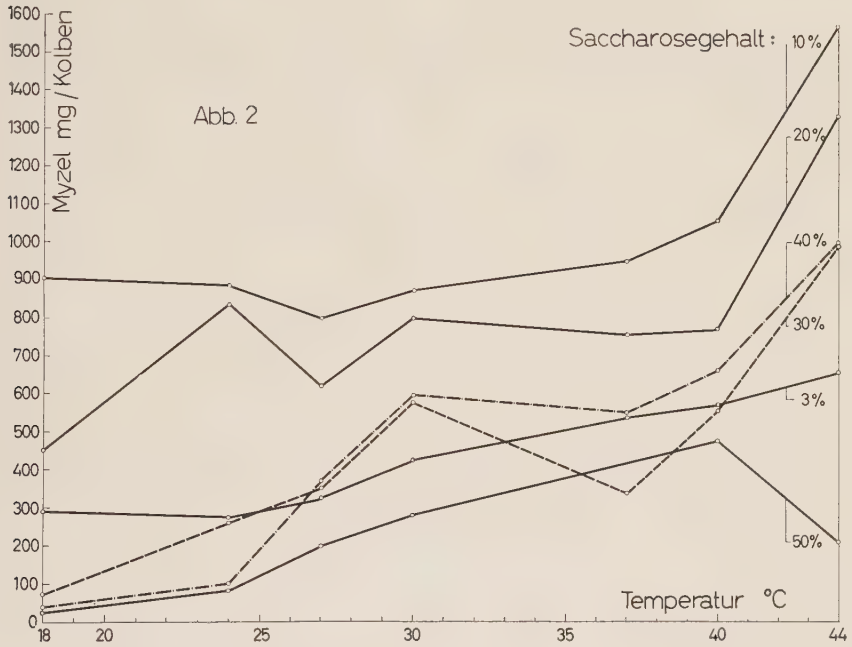

Abb. 2. Der Einfluß der Temperatur und des Zuckergehaltes in der Czapek-Nährlösung auf das Myzelgewicht von Stamm M 3678 (*Thielavia terricola*)

Mit 3 % Zucker in der Nährlösung bildet der Pilz bei 24 °C durchschnittlich 55 mg je Kolben mehr Myzel als bei 27 °C. Mit Saccharoseanteilen von 10 % und 20 % ist das Myzelgewicht bei 27 °C geringer als bei 24 °C, was mit dem Wachstum auf den Petrischalen übereinstimmt.

§ 3 Wasserstoffionenkonzentration

Die Angaben über das Wachstum von *Thielavia* und *Thielaviopsis* bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen sind uneinheitlich. Das erklärt sich, wenn man bedenkt, daß fast stets die Wirkung der Bodenazidität auf den Erfolg von Infektionsversuchen beurteilt worden ist und die Zusammensetzung der verwendeten Böden unterschiedlich gewesen sein mußte. Zudem ist zu bezweifeln, ob immer der angegebene Pilz für die Untersuchungen verwendet worden ist.

Nach Anderson et al. (1926), Schaffnit und Meyer-Hermann (1930), Tiddens (1933), Osmun (1933), Bordeleau (1934), Sattler (1936), Levykh (1939), Kightlinger (1946), Gilmore (1947), Mooi-Bok (1952) und Keller und Shanks (1955) publizierte, wie in § 2 erwähnt, Lucas (1955) Ergebnisse über pH-Versuche mit *Thielaviopsis*, die er auf synthetischen Nährböden

wachsen ließ. LUCAS bezeichnete den pH-Bereich von 3,9 bis 6,2 als optimal für *Thielaviopsis*, oberhalb pH 7,2 und unterhalb 3,3 blieb das Wachstum aus.

Versuch Nr. 2: Bei welcher Wasserstoffionenkonzentration wächst *Thielavia* am besten?

In Reagenzröhrchen wurden je 6 ml Czapek-Nährlösung, vermischt mit Phosphat-Universalpuffer nach TEORELL und STENHAGEN (1939) eingefüllt. Die Röhrchen wurden nach dem Autoklavieren mit 0,1 ml einer Suspension beimpft und bei 27 °C inkubiert. Je Stamm und je pH-Stufe waren 3 Parallelen vorhanden. Beim Sterilisieren wurden die Lösungen um 0,1 bis 0,4 pH-Einheiten saurer. Das Wachstum bonitierten wir alle 2 Tage, und am 22. Inkubationstag ermittelten wir den End-pH-Wert.

Tabelle 4

Wachstum von zehn *Thielavia*-Stämmen bei verschiedenen pH-Werten in Czapek-Nährlösung und End-pH-Werte nach 22 Tagen

Art	Stamm Nr. ETH	Anfangs-pH-Werte									
		2,9		3,9		5,0		6,0		7,0	
		Wachstum	End-pH	Wachstum	End-pH	Wachstum	End-pH	Wachstum	End-pH	Wachstum	End-pH
T. bas.	M 3676	+	3,5	++	6,8	++	6,7	+	6,8	+	7,0
T. ter.	M 3653	—		++	7,1	++	7,3	+	6,4	+	7,2
T. ter.	M 3678	—		++	6,5	++	6,5	+	6,7	—	
T. Sep.	M 3674	—		+	4,1	++	7,8	++	7,7	+	7,8
T. Sep.	M 3675	+	3,6	++	7,4	++	7,4	++	7,0	+	7,1
T. Sep.	M 3679	—		—		++	6,0	+	6,1	—	
T. sp.	M 3670	—		++	7,1	++	7,3	+	6,4	—	
T. sp.	M 3671	+	2,9	+	4,7	+	6,7	++	6,7	+	7,5
T. sp.	M 3672	—		++	6,8	++	7,1	+	6,4	—	
T. sp.	M 3677	—		++	7,1	++	6,9	++	6,6	—	

Es bedeuten: — = kein Wachstum, + = wenig Wachstum, ++ = gutes Wachstum.
Bei Anfangs-pH-Werten von 2,0 und 7,9 wuchs kein *Thielavia*- oder *Thielaviopsis*-Stamm.

Aus den in Tabelle 4 zusammengestellten Ergebnissen ist zu entnehmen, daß gutes Wachstum zwischen Initial-pH 3,9 und 6,0, kein Wachstum unterhalb pH 2,9 und oberhalb pH 7,9 festgestellt werden konnte. Die Wasserstoffionenkonzentration der Nährlösung verschiebt sich im Verlaufe der Inkubation gegen den Neutralpunkt und die schwach basische Seite hin.

In einem anderen Versuch prüften wir das Wachstum des *Thielavia terricola*-Stammes M 3678 in 500-ml-Kolben mit Czapek-Nährlösung in Stand- und Schüttelkulturen bei 30 °C. Die pH-Werte zwischen 3,0 und 8,0 wurden hier mit 1 n NaOH bzw. 1 n HCl eingestellt, sie veränderten sich durch das Autoklavieren weniger stark als beim ersten pH-Versuch.

Am 45. Inkubationstag ernteten wir die Kulturen und stellten den Durchschnitt der Myzelgewichte je 500-ml-Kolben fest.

Tabelle 5

Veränderung der pH-Werte

im Verlaufe der Inkubationszeit und Myzelgewichte in Stand- und Schüttelkulturen von *Thielavia terricola*, Stamm M 3678 (Zahlen = pH-Werte)

Inkubationszeit Tage	Anfangs-pH											
	Standkultur						Schüttelkultur					
	3 0	4,3	5,2	6,0	7,1	7,6	3,0	4,3	5,2	6,0	7,1	7,6
1	3,1	4,3	5,3	6,0	7,3	7,5	3,2	4,2	5,2	6,1	7,1	7,5
5	6,7	6,9	6,7	6,7	7,1	7,4	7,0	7,4	7,5	7,4	7,7	7,8
10	7,4	7,4	7,3	7,1	7,4	7,6	7,7	7,8	7,7	7,5	7,9	8,1
13	7,4	7,5	7,3	7,3	7,4	7,5	7,6	7,8	7,8	7,7	8,1	8,2
17	7.6	7,7	7,8	7,7	7,8	7,7	7,8	8,0	8,0	7,9	8,1	8,2
45	7,9	7,8	7,5	7,9	8,0	8,1	8,3	7,8	7,9	8,0	8,5	8,3
Myzelgewicht am 45. Tag ∅ mg/Kolben	859	700	699	608	320	245	646	603	635	552	482	496

In Tabelle 5, welche die Ergebnisse dieses Versuches aufzeigt, kommt die erwähnte Verschiebung der pH-Werte gegen die basische Seite hin bei allen pH-Stufen deutlich zum Ausdruck, und zwar in Schüttelkultur noch ausgeprägter als in Standkultur.

Je mehr sich der Anfangs-pH-Wert der basischen Seite nähert, desto geringer wird das Myzelgewicht der Stand- und Schüttelkulturen. Im Durchschnitt ist das Myzelgewicht der Standkulturen bei den Anfangs-pH-Werten 3,0, 4,3, 5,2 und 6,0 höher als dasjenige der Schüttelkulturen. Bei den pH-Werten von 7,1 und 7,6 ist das Verhältnis umgekehrt. Das Oberflächenmyzel wird hier erst nach etwa siebentägigem submersem Wachstum ausgebildet.

In einem weiteren Versuch mit Czapek-Nährlösung wurden die Veränderungen der pH-Werte und der Myzelgewichte bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C ermittelt.

Der pH-Wert der autoklavierten

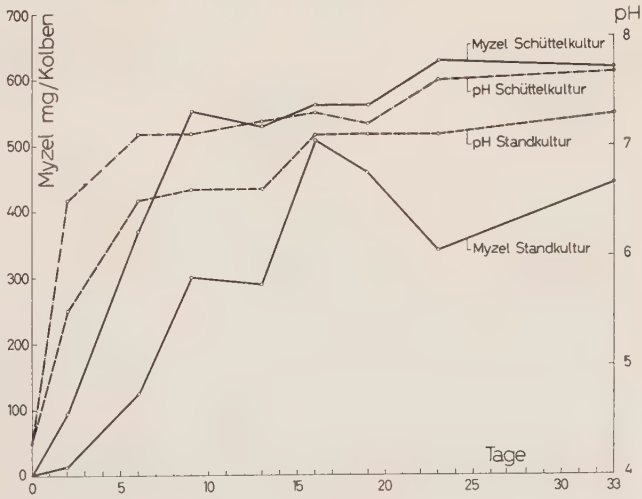

Abb. 3. Veränderung der pH-Werte und der Myzelgewichte von *Thielavia terricola* im Verlaufe der Inkubationszeit in Stand- und Schüttelkultur

Czapek-Nährlösung betrug 4,3. Wie aus Abbildung 3 hervorgeht, bewirkt ein starkes Myzelwachstum in den ersten 9 Tagen Absinken der Wasserstoffionenkonzentration. Sobald das Myzelgewicht konstant bleibt oder, wie in der Standkultur, leicht sinkt, verändert sich das pH nur noch schwach.

§ 4 Licht

Über die Lichtabhängigkeit von *Thielavia* und *Thielaviopsis* sind in der Literatur nur wenige Hinweise gegeben. Da es sich um bodenbewohnende Pilze handelt, war anzunehmen, daß das Licht eine untergeordnete Rolle spielen würde.

SATTLER (1936) untersuchte den Einfluß des Lichtes auf Wachstum, Sporenbildung und Keimfähigkeit des Wurzelbräunepilzes. Nach seinen Beobachtungen ist das Licht ohne Bedeutung für das Wachstum von *Thielaviopsis*.

Versuch Nr. 3: Welchen Einfluß hat das Licht auf das Wachstum von *Thielavia*?

In einen heizbaren Wassertrog im Gewächshaus brachten wir zwei Serien von je 30 Reagenzröhrchen auf zwei Holzleisten, die bis zur Hälfte schräg in 37 °C warmes Wasser eingetaucht wurden. Die Röhrchen, die Czapek-Schrägagar enthielten, wurden mit 10 *Thielavia*-Stämmen in 3 Parallelen trocken beimpft. Die eine Serie wurde vollständig gegen Licht abgeschirmt, die andere Reihe war dem Tageslicht (Monat August) exponiert. Die Wachstumskontrolle erfolgte jeden Tag.

Tabelle 6

Der Einfluß des Lichtes
auf das Wachstum und die Myzelfarbe von zehn *Thielavia*-Stämmen

Art	Stamm-Nr. ETH	Anzahl Tage bis Oberfläche bedeckt		Farbe des Myzels	
		hell	dunkel	hell	dunkel
Thielavia basicola	M 3676	2	3	weiß	weiß
Thielavia Sepedonium	M 3674	4	3	weiß	gelb
Thielavia Sepedonium	M 3675	2	3	weiß	gelb
Thielavia Sepedonium	M 3679	3	3	weiß	gelb
Thielavia terricola	M 3653	3	3	weiß	weiß
Thielavia terricola	M 3678	2	2	weiß	weiß
Thielavia sp.	M 3670	2	2	weiß	weiß
Thielavia sp.	M 3671	4	3	weiß	gelb
Thielavia sp.	M 3672	2	2	weiß	weiß
Thielavia sp.	M 3677	4	3	grau	grau

Wie aus Tabelle 6 ersichtlich ist, bestätigt Versuch Nr. 3 die Vermutung, daß der Lichteinfluß auf das Wachstum von *Thielavia* nicht von Bedeutung sein kann. Die Unterschiede zwischen den im Dunkeln und am Tageslicht gewachsenen Kolonien sind sehr gering. Auch die Ausbildung der Perithecien und Ascosporen sowie deren Reifezustand und Größe waren in beiden Versuchsserien gleich.

Die *Thielavia Sepedonium*-Stämme unterscheiden sich in der Myzelfarbe von den anderen *Thielavia*-Stämmen. In der Dunkelheit produzieren die

ersteren einen gelben Farbstoff, der bei Tageslicht nur ganz schwach oder überhaupt nicht gebildet wird. Sehr ausgeprägt ist dieser Weiß-Gelb-Effekt bei *Thielavia Sepedonium* Stamm M 3674.

Im Verlaufe unserer Arbeiten haben wir nie beobachtet, daß außer *Thielavia Sepedonium* eine weitere *Thielavia*-Art die Fähigkeit zur Bildung eines gelben Farbstoffes besitzt. Diese Feststellung erlaubt die Unterscheidung der *Thielavia Sepedonium*-Stämme von den anderen *Thielavia*-Arten. Der unbekannte Stamm M 3671 dürfte demnach *Thielavia Sepedonium* sein, da sein Myzel in der Dunkelheit gelb wird.

Mit dem von *Thielavia Sepedonium* ins Kulturfiltrat ausgeschiedenen gelben Farbstoff befaßten wir uns etwas eingehender. Stamm M 3674 inkubierten wir 22 Tage in Czapek-Nährlösung bei 27 °C als Stand- und Schüttelkultur. Nach 6 Tagen setzte eine leichte Gelbfärbung ein, die in den folgenden Tagen intensiver und vom 15. Tage an nicht mehr verändert wurde. Die Farbtönung war in der Schüttelkultur ausgeprägter als in der Standkultur.

Mit dem Spektralphotometer (Zeiss PMQ II) ließ sich die Farbe nicht eindeutig identifizieren. Im Ultraviolettbereich von $\lambda = 220$ bis 235 mμ wurde ein nicht genau definiertes Extinktionsmaximum gefunden, ein Extinktionsminimum konnte nicht ermittelt werden.

Farbstoffe sind bei *Aspergillus, Penicillium, Fusarium* und *Helminthosporium* keine seltene Erscheinung (Spinulosin, Fumigatin, Aspergillorubin, Fusarubin, Javanicin u. a. m.). Gelbe und rote *Aspergillus-, Penicillium-* und *Helminthosporium*-Farbstoffe gehören zu den Anthrachinonen, z. B. das gelb gefärbte Parietin (= Physcion) der Flechten (Thomas 1939) und der Aspergillen. Thomas (1939) stellte fest, daß einige Flechtenstämme in der Dunkelheit das gelbe Parietin in größeren Mengen produzieren als bei Tageslicht. Obwohl wir in unseren *Thielavia Sepedonium*-Kulturen keine Kristalle beobachten konnten, ist es denkbar, daß es sich beim vorliegenden Farbstoff um Parietin oder ein ähnliches Anthrachinon handelt. Da die Entwicklung des Pigmentes von *Thielavia Sepedonium* ebenfalls von der Belichtung abhängt, wird diese Vermutung verstärkt.

§ 5 Ernährung

a) Allgemeines über die Ernährung von *Thielavia*

Die Differenzierung von *Thielavia* und *Thielaviopsis* gelang Lucas (1948) nicht nur mit Hilfe von Temperaturabstufungen, sondern auch mit der Anwendung von verschiedenen Nährmedien. Die Angaben von Lucas beruhen auf folgenden Beobachtungen:

	Wachstum von *Thielavia*	Wachstum von *Thielaviopsis*
auf Richard-Nährlösung ohne Zucker, mit Faltenfilter (Zellulose)	schnell	wenig oder fehlend
auf Karottenscheiben	langsam oder fehlend	schnell
auf Kartoffel- oder Rübenagar	gut	fehlend

4 *Thielavia*- und 4 *Thielaviopsis*-Stämme testeten wir bei 27 °C auf den von LUCAS angegebenen Nährmedien sowie in Czapek- und Richard-Nährlösung (Richard-NL: 50 g Glukose, 10 g NH_4NO_3, 5 g KH_2PO_4, 2,5 g $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$, 0,02 g $FeCl_3$, aqua dest. ad 1000 ml, pH 5,0) und auf Kartoffel-Dextrose-Agar nach HEYNES et al. (1955): 20 g Glukose, 0,2 g $CaCO_3$, 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$, Dekokt von 200 g Kartoffeln in 500 ml Wasser, 15 g Agar, aqua dest. ad 1000 ml.

Tabelle 7

Wachstum von vier *Thielavia*- und *Thielaviopsis*-Stämmen bei 27 °C nach 22 Tagen auf 6 verschiedenen Nährmedien

Nährmedium	*Thielavia*				*Thielaviopsis*			
	terr. M3653	*sp.* M3670	*sp.* M3671	*sp.* M3672	*sp.* M3621	*sp.* M3622	*sp.* M3623	*sp.* M3624
Richard-NL ohne Glukose, jedoch mit Zellulose ...	++	+++	+++	+++		—	—	—
Richard-Nährlösung	+++	+++	+++	+++	—	—	—	—
Czapek-Nährlösung	+++	+++	+++	+++	—	—	—	—
Kartoffel-Agar	++	+++	++	++			—	-
Kartoffel-Dextrose-Agar ..	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
Karottenscheiben	+++	+++	+++	+++	++	+++	+	+

Es bedeuten: +++ = sehr gutes Wachstum, ++ = gutes Wachstum, + = schlechtes Wachstum, — = kein Wachstum.

Unsere Resultate in Tabelle 7 stimmen mit denjenigen von LUCAS bei zwei Nährmedien, nämlich Richard-Nährlösung ohne Zucker, dafür als C-Quelle mit Faltenfiltern (Zellulose) und Kartoffelagar, überein. Auf Karottenscheiben wuchsen dagegen in unserem Versuch die *Thielavia*-Kulturen sogar rascher als *Thielaviopsis*, was vielleicht auf unterschiedlichem Wuchsstoffgehalt von Karotten verschiedener Provenienz beruht. Bemerkenswert ist das ungleiche Verhalten von *Thielavia* und *Thielaviopsis* in Richard- und Czapek-Nährlösung: Erstere wächst in diesen Medien gut, wogegen letztere kein Wachstum zeigt. Dieses Resultat bestätigt die Ansichten von STEINBERG (1950 a) und STOVER (1956 a), daß *Thielaviopsis* mit Nitrit- und Nitratstickstoff nicht, mit Ammonstickstoff nur mäßig wachsen kann (vgl. § 5 c). Auf Kartoffel-Dextrose-Agar wachsen Stämme beider Gattungen etwa gleich gut.

Versuch Nr. 4: Bestehen Unterschiede im Wachstum von 10 *Thielavia*-Stämmen auf verschiedenen Agarnährböden?

Als Nährmedien gelangten zur Anwendung:

a) Czapek-Agar.
b) Asparagin-Saccharose-Agar (10 g Asparagin, 50 g Saccharose, 0,6 g KCl, 1,6 g $CaHPO_4 \cdot 2\,H_2O$, 0,7 g $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$, 20 g Agar, aqua dest. ad 1000 ml).
c) Hefeextrakt-Agar (4,0 g Hefeextrakt Difco, 10 g Malzextrakt Ferment AG, Basel. 4 g Glukose, 15 g Agar, aqua dest. ad 1000 ml).

Von verschiedenen *Thielavia*-Arten wurden insgesamt 10 Stämme auf den obengenannten Medien in je 5 Parallelen bei 27 °C in Petrischalen kultiviert. In Tabelle 8 ist angegeben, nach durchschnittlich wieviel Tagen die Agaroberfläche von der Pilzkolonie vollständig bedeckt war.

Tabelle 8

Wachstum von zehn *Thielavia*-Stämmen auf verschiedenen Agarmedien in Petrischalen (⌀ 90 mm) bei 27 °C

Art	Stamm-Nr. ETH	Anzahl Tage, bis Myzel die Oberfläche des Agars in der Petrischale bedeckt		
		a) Czapek-Agar	b) Asparagin-Saccharose-Agar	c) Hefeextrakt-Agar
Thielavia basicola	M 3676	13	13	14
Thielavia Sepedonium	M 3674	12	11	14
Thielavia Sepedonium	M 3675	10	11	15
Thielavia Sepedonium	M 3679	17	11	15
Thielavia terricola	M 3653	15	14	14
Thielavia terricola	M 3678	20	22	17
Thielavia sp.	M 3670	13	15	14
Thielavia sp.	M 3671	13	13	15
Thielavia sp.	M 3672	12	15	16
Thielavia sp.	M 3677	10	10	10

Ergebnisse:

1. Die Arten lassen sich nicht durch Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit differenzieren.
2. Die Zuwachsrate der einzelnen Stämme auf allen drei Medien ist etwa gleich; auch der Gehalt von Medium c) an natürlichen Stoffen führt nicht zu einem Unterschied.
3. Stamm M 3678, *Thielavia terricola*, der einen Hemmstoff produziert (vgl. Kap. 3), fällt durch langsameres Wachstum auf.

b) Kohlenstoff-Quelle

Vorversuche haben gezeigt, daß *Thielavia* in Czapek-Nährlösung mit 3 % Saccharose gut gedeiht. Zunächst sollte geprüft werden, wie die Zuckerkonzentration auf das Wachstum wirkt.

Versuch Nr. 5: Welchen Einfluß hat die Saccharosekonzentration auf das Wachstum von 10 *Thielavia*-Stämmen?

Reagenzgläser, die je 10 ml sterile Czapek-Nährlösung mit 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60 und 70 % Saccharose enthielten, wurden mit Myzel von 10 *Thielavia*-Stämmen beimpft und schrägliegend bei 37 °C inkubiert. Das Wachstum wurde zweimal täglich geschätzt; es stimmte in den für jede Konzentration und jeden Stamm angelegten fünf Parallelkulturen überein.

Ergebnis: Bis zu 48 % Saccharosegehalt zeigten die Stämme gutes Wachstum; oberhalb 12 % ist die Wachstumsgeschwindigkeit vermindert. Bei

60 % wuchsen nur noch M 3670 und M 3672, zwei nicht bestimmte *Thielavia*-Stämme, mit sehr wenig Myzel. Eine geschlossene Luftmyzeldecke bildeten alle Kulturen am 4. Inkubationstag in den Lösungen mit 3 bis 12 % Zucker, am 5. Tage bei Konzentrationen von 24 und 36 % Saccharose. Die *Thielavia Sepedonium*-Stämme wuchsen mit 48 % Zucker nur submers.

Hinsichtlich der Qualität der C-Quelle scheint *Thielavia* wenig anspruchsvoll zu sein. So deuten die Resultate in Tabelle 7 darauf hin, daß die Zellulose aus dem Faltenfilter, die Glukose in der Richard-Nährlösung, die Saccharose in der Czapek-Nährlösung sowie die Stärke im Kartoffelagar als Kohlenstoffquellen verwertet werden.

Einige ausgewählte *Thielavia*-Stämme gediehen mit Glukose ebenso gut wie mit Saccharose; mit Zellulose und Stärke wuchsen sie zwar langsamer, doch hat die Tatsache, daß Zellulose abgebaut wird, für die Tropen große Bedeutung. WHITE et al. (1948) testeten in südwestpazifischen Gebieten und in Indien gesammelte Pilze auf Baumwollgeweben. Von den geprüften Ascomyceten zerstörten *Chaetomium spec.* und *Thielavia Sepedonium* das Gewebe innerhalb 9 Tagen so stark, daß es sich ohne Mühe zerreißen ließ. KLEMME et al. (1945) beobachteten den gleichen Effekt auf Baumwolle mit *Thielavia terricola*, ebenso ABRAMS (1950) mit *Thielavia spec.*

Genaueren Aufschluß über die Verwertbarkeit verschiedenartiger C-Quellen sollte der folgende Versuch geben.

Versuch Nr. 6: Wie wirken 16 verschiedene C-Quellen auf das Wachstum von *Thielavia terricola* Stamm M 3678?

Die verwendeten C-Quellen sind in Tabelle 9 verzeichnet. Tastversuche haben gezeigt, daß sich andere *Thielavia*-Stämme im Verhalten gegenüber den C-Quellen vom Stamm M 3678 nicht unterscheiden.

Czapek-Nährlösung (ohne C-Quelle pH 4,9) enthielt 3 % je eines C-haltigen Stoffes (siehe Tab. 9). Fünf 500-ml-Erlenmeyerkolben je Zucker oder Alkohol mit je 100 ml Nährlösung wurden autoklaviert, mit je 1 ml Sporensuspension beimpft und bei 30 °C unbewegt inkubiert.

Petrischalen mit Czapek-Agar, dessen C-Quellen wie in den Nährlösungen verändert waren, dienten nach Beimpfung und Inkubation bei 30 °C als Wachstumskontrollen zu 12 der 16 Varianten des flüssigen Mediums.

In Tabelle 9 sind die beurteilten Daten verzeichnet: die nach 45tägiger Inkubation erhaltenen Mittelwerte der Myzelgewichte und das Koniewachstum auf Agarnährböden (ermittelt wie in Versuch Nr. 4). Die Zahlen der letzten Spalte (biologische Aktivität) werden im Kapitel 3 § 2 besprochen.

In der Spalte „Myzelgewicht" (Tab. 9) treten vorerst die niederen Werte hervor, die auf Alkohole als C-Quellen zurückzuführen sind. Auch Ribose wird nicht besser verwertet. In diesen Kulturen erschien kein Oberflächenmyzel. Die beiden Zucker, die am meisten Myzelbildung bewirkten, finden wir unter den Disacchariden: Trehalose und Maltose. Die Pentosen, außer Ribose, die Tri- und Polysaccharide nehmen eine Mittelstellung zwischen den Alkoholen und den Hexosen ein.

Das Wachstum der Agarkulturen (Tab. 9, erste Spalte) entspricht nur bei Disacchariden und Hexosen etwa der Myzelproduktion in flüssigen Me-

Tabelle 9

Wachstum, Myzelgewicht und biologische Aktivität von *Thielavia terricola*, M 3678, auf Czapek-Nährlösung mit verschiedenen C-Quellen. Inkubationstemperatur: 30 °C

Kohlenstoffquelle	Anzahl Tage bis Myzel die Oberfläche des Agars in der Petrischale bedeckt (⌀ 90 mm)	Myzelgewicht nach 45 Tagen Inkubation ⌀ mg/Kolben	Anzahl Tage bis Aktivität gegen *Staph. aureus* und *Bacillus subtilis* auftritt
1. Monosaccharide			
a) Pentosen:			
D(—)-Ribose (puriss.)	10	54	19
L(+)-Arabinose (Kerfoot)	—	414	13
L(—)-Xylose (Kerfoot)	—	309	36
L(+)-Rhamnose (Kerfoot)	18	217	24
b) Hexosen:			
Dextropur (Glycosum puriss. anhydric.)	20	563	19
D-Galaktose (anhydric. Kerfoot)	22	673	9
D(—)-Fructose (Kerfoot)	23	564	36
2. Disaccharide			
d-α-α-Trehalose (puriss. Fluka)	13	722	19
D(+)-Maltose (Hydrat, Kerfoot)	18	698	13
Saccharose (Handelsware)	18	476	13
3 Trisaccharide			
D(+)-Raffinose (Kerfoot)	20	160	13
4. Polysaccharide			
Inulin (Kerfoot)	—	308	9
5. Dreiwertige Alkohole			
Glycerin	7	78	—
6. Sechswertige Alkohole			
D(—)-Sorbit (Hydrat, Kerfoot)	7	65	9
D(—)-Dulcit (wasserfrei, Kerfoot)	—	45	9
Mannit (Fluka)	7	65	13

dien. Hier und auf den Agarmedien mit Pentosen, Tri- und Polysacchariden wuchsen die Kolonien mit weißem Luftmyzel. Die Nährböden mit Alkoholen wurden schnell von hyalinem Substratmyzel überwachsen; dort kehrten sich die Beziehungen zwischen Myzelgewicht in Flüssigkeitskultur und Koloniewachstum auf Agarnährböden um.

Im folgenden Versuch bestimmten wir zweimal wöchentlich den Glukose- und Stickstoffgehalt im Kulturfiltrat von *Thielavia terricola* Stamm M 3678, der bei 30 °C in Czapek-Lösung mit 3 % Glukose wuchs.

Versuch Nr. 7 a: Wie groß ist der Zuckerverbrauch von *Thielavia terricola* in Czapek-Nährlösung bei 30 °C?

Generell stellen wir an Hand von Abbildung 4 und 5 fest, daß der Zuckerabbau in Schüttelkulturen größer ist als in Standkulturen. Die Glukose wird jedoch bei beiden Kulturarten auch während 33 Tagen Inkubation nicht

restlos verbraucht. Vom 23. Tage an nimmt die Zuckerkonzentration in den Kulturfiltraten nur noch schwach ab, in der Schüttelkultur bleibt sie sogar konstant. Ein weiterer, mit *Thielavia terricola* Stamm M 2912 analog ausgeführter Versuch ergab gleichartige Ergebnisse.

c) Stickstoff-Quelle

In der Besprechung der Tabelle 7 (§ 5 a) haben wir bereits erwähnt, daß *Thielavia* in bezug auf die N-Quelle bedeutend anspruchsloser ist als *Thielaviopsis*. Jede geprüfte natürliche oder synthetische Stickstoffquelle wurde von *Thielavia* ausgenützt. Hingegen blieb das Wachstum von *Thielaviopsis* in Nährmedien mit Nitrat immer und mit Ammonium teilweise aus. Nach ROBBINS (1937) und STEINBERG (1939, 1950 b) ist *Thielavia* in die Gruppe der Pilze einzuteilen, die fähig sind, Nitrat-, Ammon- und organischen Stickstoff aufzunehmen, ja möglicherweise sogar Luftstickstoff zu verwerten. *Thielaviopsis* dagegen würde der Gruppe zugeschrieben, welche organischen Stickstoff (z. B. Peptone, Peptide, Aminosäuren) bevorzugt, was LILLY und BARNETT (1951), STEINBERG (1950 a), STOVER (1956 a) und andere Autoren bestätigen. In ihren Versuchen verwendeten sie meistens Asparaginsäure als N-Quelle. Nach HENDERSON (1941) soll es sogar möglich sein, *Thielaviopsis* in Feldkulturen mit Hilfe von Stickstoffdüngern (Harnstoff, Nitrat- und Ammonstickstoff) erfolgreich zu bekämpfen.

Der zweite Teil des Versuches Nr. 7 beschäftigt sich mit der Veränderung des Stickstoffgehaltes im Filtrat einer *Thielavia*-Kultur.

Versuch Nr. 7 b: Wie ändert sich der Stickstoffanteil im Kulturfiltrat von *Thielavia terricola* M 3678 in Czapek-Nährlösung bei 30 °C?

Aus den Abbildungen 4, 5 und 6 geht hervor, daß in Schüttelkulturen nicht nur mehr Glukose, sondern auch mehr Stickstoff verbraucht wird als in Standkulturen. Auffallend ist das Ansteigen des NO'_3-Gehaltes in den Standkulturen bis zum 13. Inkubationstag. Die Vermutung liegt nahe, daß hier Stickstoff aus der Luft aufgenommen worden ist. Auch der erneute Anstieg in den Standkulturen nach dem 19. Tage auf den ursprünglichen Gehalt oder sogar höher bekräftigt diese Mutmaßung. In der Schüttelkultur sinkt der NO'_3-Gehalt, unterbrochen von einem leichten Anstieg zwischen dem 16. und 19. Tag, bis auf 145 mg NO'_3 im Kolben am 23. Inkubationstag. In den folgenden 10 Tagen steigt der Stickstoffgehalt, analog der Standkultur, wiederum stark an. Ähnliche Beobachtungen über die Nitratzunahme im Filtrat der Kulturen von *Gibberella fujikuroi* erwähnt STOLL (1954). Die verwendete Nitrat-Bestimmungsmethode arbeitet mit einer Genauigkeit von 0,2 mg NO'_3/Liter.

d) Andere Nährstoffe

Da viele Stämme der mit *Thielavia* verwandten Gattung *Aspergillus* auf geringe Änderungen im Schwermetallgehalt des Substrates durch Wechsel ihrer Koloniefarbe reagieren (NICHOLAS und FIELDING 1951, SARASWATHI DEVI 1954), fragten wir, wie stark die drei Schwermetalle Eisen, Kupfer und

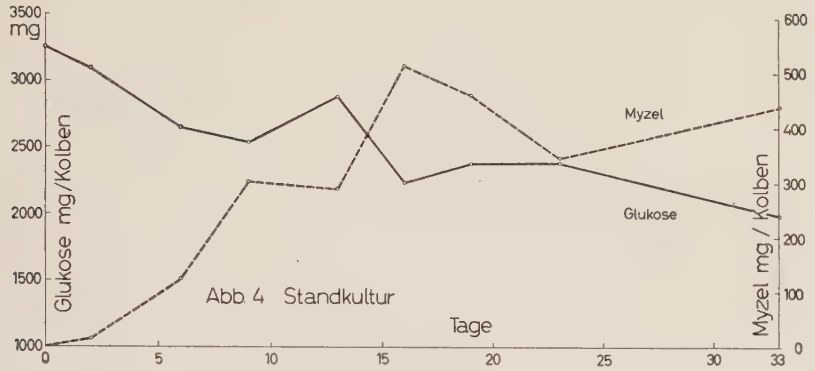

Abb. 4. Glukose-Abbau und Myzelgewicht von *Thielavia terricola*, Stamm M 3678, in Standkultur bei 30 °C mit Czapek-Nährlösung

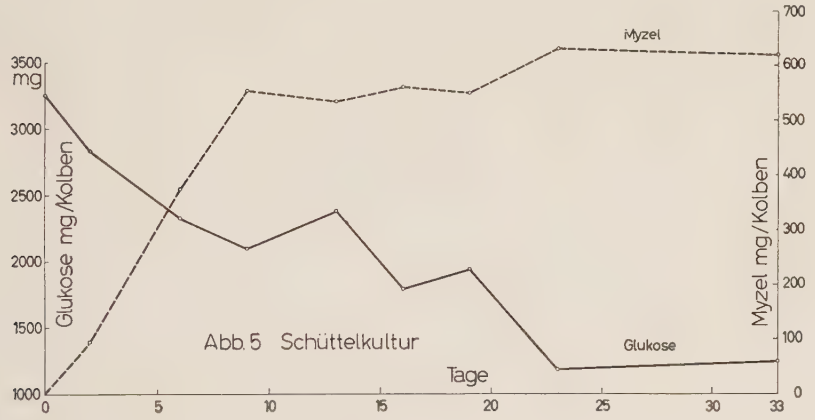

Abb. 5. Glukose-Abbau und Myzelgewicht von *Thielavia terricola*, Stamm M 3678, in Schüttelkultur bei 30 °C mit Czapek-Nährlösung

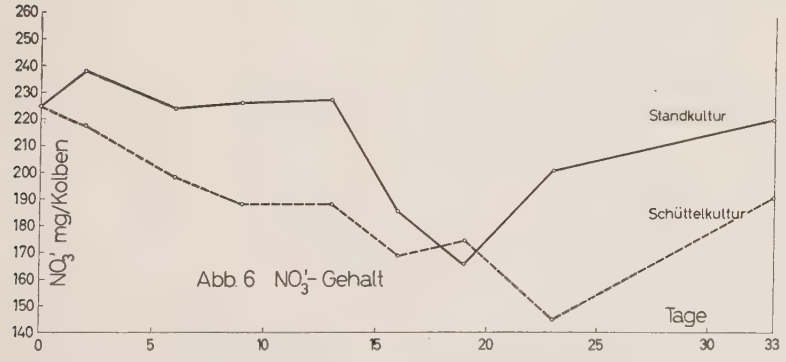

Abb. 6. Der Stickstoffverbrauch von *Thielavia terricola*, Stamm M 3678, in Stand- und Schüttelkultur bei 30 °C

Zink das Wachstum von *Thielavia* und, als Vergleich, von *Thielaviopsis* beeinflussen.

Versuch Nr. 8: Welchen Einfluß hat der Zusatz von Fe″, Cu″ und Zn″ in Czapek-Kartoffelsaft-Nährlösung auf das Wachstum von 2 *Thielavia*- und 2 *Thielaviopsis*-Stämmen bei 27 °C?

Die Czapek-Nährlösung ohne $FeSO_4 \cdot 7\,H_2O$ wurden 10 % Kartoffelsaft (Filtrat von 200 g geschälten, mit 500 ml bidest. Wasser gekochten Kartoffeln) beigemischt. Ohne Kartoffelsaft wächst *Thielaviopsis* in Czapek-Lösung nicht. Als Metallzusätze verwendeten wir: Eisen als $FeCl_2 \cdot 4\,H_2O$, Kupfer als $CuCl_2 \cdot 2\,H_2O$ und Zink als $ZnCl_2$, alle in den Endkonzentrationen 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} und 10^{-5} molar. 100-ml-Erlenmeyerkölbchen wurden mit je 20 ml Nährmedium beschickt, autoklaviert und mit 0,1 ml Sporensuspension der *Thielavia*-Stämme M 3676 und M 3678 sowie der *Thielaviopsis*-Stämme M 3622 und M 3673 beimpft. Je Stamm, Konzentration und Schwermetall waren 5 Parallelen angesetzt. Nach 24 Tagen Inkubation bei 27 °C wurden die Myzelgewichte der einzelnen Versuchsserien ermittelt. Als Kontrollen dienten Kulturen in Czapek-Kartoffelsaft-Nährlösung ohne Schwermetallzusätze.

Tabelle 10

Myzelgewichte

von zwei *Thielavia*- und zwei *Thielaviopsis*-Stämmen auf Czapek-Kartoffelsaft-Nährlösung mit verschiedenen Schwermetallzusätzen

Schwermetall	Konz. mol.	*Thielavia*		*Thielaviopsis*	
		basicola M 3676	*terricola* M 3678	*basicola* M 3673	*sp.* M 3622
Kontr.		100	100	100	100
Fe	10^{-2}	108*)	11	16	37
Fe	10^{-3}	105	73	68	89
Fe	10^{-4}	92	97	111	145
Fe	10^{-5}	106	105	123	176
Cu	10^{-2}	4	2	4	11
Cu	10^{-3}	84	60	35	45
Cu	10^{-4}	91	92	54	80
Cu	10^{-5}	92	97	59	92
Zn	10^{-2}	103	115	28	41
Zn	10^{-3}	106	105	75	140
Zn	10^{-4}	106	90	105	122
Zn	10^{-5}	104	93	116	128

*) Die Zahlen bedeuten prozentuale Gewichte, bezogen auf das Myzelgewicht der Kontrollen = 100 %.

Durch Zugabe von Kartoffelsaft zum Nährmedium wurde das Substrat mit einer unkontrollierbaren Menge von Makro- und Mikronährstoffen versetzt. Die Aschebestandteile der Kartoffelknolle sind nach KLEIN (1932)

hauptsächlich: K, P, S, Mg, Na, Ca, Cl, Si und Fe; so war bei unserem Versuch in der Stammlösung außer den vermehrten Makronährstoffen eine geringe Menge Eisen vorhanden (1,1 Teile Fe_2O_3 auf 100 Teile Asche).

Vergleichen wir in Tabelle 10 die Myzelgewichte der beiden *Thielavia*-Stämme M 3676 (*T. basicola*) und M 3678 (*T. terricola*), so stellen wir große Gewichtsunterschiede in den eisenhaltigen Lösungen fest. Das Wachstum von *Thielavia basicola* in den Medien mit Eisen ergibt keine von der Kontrolle wesentlich verschiedenen Resultate; *Thielavia terricola* wird jedoch bei Fe-Konzentrationen von 10^{-2}, 10^{-3} und 10^{-4} molar im Wachstum gehemmt.

Kupfer wirkte sich in allen Konzentrationen bei beiden Stämmen hemmend aus. Sempio (1934) gibt an, daß *Thielavia*-Sporen in Saccharose-Glykokoll-Nährlösung mit 10^{-3} mol Kupfer (als Nitrat) gleich gut keimen wie in der kupferfreien Kontrolle. Möglicherweise beeinflußt Kupfer nicht die Sporenkeimung, wohl aber das Myzelwachstum.

Je höher der Zinkgehalt gewählt wird, desto besseres Wachstum zeigt *Thielavia terricola*. Der andere *Thielavia*-Stamm wächst dagegen mit allen gewählten Zinkkonzentrationen gleich stark.

Die *Thielaviopsis*-Kulturen werden durch Eisen in Konzentrationen von 10^{-4} und 10^{-5} mol im Wachstum angeregt, Stamm M 3622 in stärkerem Maße als M 3673. Analogen Einfluß hat das Zink in niederen Konzentrationen. Steinberg (1950 a) beobachtete ebenfalls, daß *Thielaviopsis* für ein maximales Gedeihen Eisen benötigt, noch wichtiger soll Zink sein. Bei einer Molarität von 10^{-2} hemmen Eisen und Zink das Wachstum von *Thielaviopsis*, Fe sogar noch bei 10^{-3} mol. Grooshevoy (1939) empfahl, die an *Thielaviopsis* erkrankten Tabakwurzeln beim Verpflanzen in eine Lösung mit 2 % Eisensulfat (entspricht ungefähr $FeSO_4$ 10^{-1} molar) einzutauchen; der Erfolg sei gut.

Kupfer führt in allen geprüften Konzentrationen bei den *Thielaviopsis*-Kulturen zu einer Wachstumsverzögerung.

Das Oberflächenmyzel blieb bei den Stämmen M 3676 und M 3678 in den kupfer- und zinkhaltigen Nährlösungen weiß, indessen fielen die Kulturen in den eisenhaltigen Medien durch Farbunterschiede auf. Bei niederen Eisen-Konzentrationen (10^{-4} und 10^{-5} molar) war die Myzeldecke weiß mit höchstens vereinzelten grauen Flecken, bei Eisen 10^{-2} und 10^{-3} molar grau. Es gelingt somit, an der Myzelfarbe von *Thielavia basicola*- und *Thielavia terricola*-Kulturen festzustellen, ob der Eisengehalt im Nährmedium entweder 10^{-4} mol und weniger oder 10^{-3} mol oder mehr beträgt.

Die *Thielaviopsis*-Kulturen wiesen in allen Serien eine einheitliche, schwarzgrau gefärbte Decke von Luftmyzel mit vereinzelten weißen Inseln auf.

Kapitel 3: Biologisch aktive Stoffwechselprodukte von *Thielavia*

§ 1 Allgemeines

Obwohl die von Gäumann (1951) geäußerte Ansicht, *Thielavia* sei ein toxinbildender Pilz, größtenteils auf den Resultaten von Sattler (1936)

basiert, d. h. statt „*Thielavia*" *Thielaviopsis* gemeint sein muß, durfte doch *Thielavia* von den Untersuchungen über biologisch aktive Stoffwechselprodukte nicht ausgeschlossen werden. Hemmstoffe waren bei *Thielavia* wegen deren systematischer Verwandtschaft mit den Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium,* aus denen Antibiotika produzierende Stämme bekannt sind, zu erwarten.

So sollten in einer ersten Prüfung neben *Thielaviopsis-* auch *Thielavia-*Stämme gesichtet werden.

Versuch Nr. 9: a) Welche *Thielavia-* und *Thielaviopsis*-Stämme produzieren einen biologisch aktiven Hemmstoff? b) Welches Kulturfiltrat dieser Stämme enthält welkeaktive Stoffe?

23 Stämme *Thielavia* in Czapek-Nährlösung und 12 Stämme *Thielaviopsis* in Knop-Hefeextrakt-Medium wurden in Stand- und Schüttelkulturen bei 27 °C (je drei 500-ml-Erlenmeyerkolben als Parallelen) inkubiert. Zweimal wöchentlich entnahmen wir jedem Kolben steril 1 ml Kulturfiltrat.

In Vorversuchen zur Entdeckung von Antibiotika kam der Agar-Verdünnungsstrichtest (AVS-Test, Waksman und Reilly 1945), später die Agar-Diffusionsmethode (Klein 1956) zur Anwendung. Als Testorganismen dienten im AVS-Test *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus megatherium* und *Candida vulgaris,* im Agar-Diffusionstest *Staphylococcus aureus* und *Bacillus subtilis.*

Nach 43 Inkubationstagen wurden die Kulturen geerntet und die Filtrate im Tomatenwelke-Test (Gäumann et al. 1950) auf eventuell vorhandene Welketoxine geprüft.

Resultate: Im AVS-Test wurden *Bacillus megatherium* und *Staphylococcus aureus* durch Kulturfiltrate von Stamm M 3678 *Thielavia terricola* gehemmt. Das Ergebnis des Diffusionstestes stimmte überein, zudem war das Kulturfiltrat in diesem Test auch gegen *Bacillus subtilis* aktiv. Trotz im Verlaufe der Arbeiten immer wieder durchgeführter Stichproben konnte entgegen unseren Vermutungen kein anderer Stamm mit Hemmwirkung gefunden werden.

Die Aktivität erschien in Schüttelkultur nach 13, in Standkultur nach 15 Tagen. Die Intensität der Hemmung nahm in den ersten 2 (Schüttelkultur) bzw. 4 Tagen zu und blieb dann während der ganzen Versuchsdauer (43 Tage) konstant.

Im Welketest erfuhren Tomatensprosse ebenfalls nur durch Filtrate von Stamm M 3678 eine Schädigung. Die Stengel waren an den Basen leicht eingeschnürt und die Gewebe dort aufgeweicht.

Alle übrigen Kulturfiltrate, die von *Thielaviopsis* eingeschlossen, zeigten sich in den benützten Tests (auch später) inaktiv.

Weitere Untersuchungen beschäftigten sich deshalb mit der Abklärung der optimalen Bedingungen für die Produktion des Hemmstoffes von Stamm M 3678.

§ 2 Kulturbedingungen

Kulturart und -gefäße, Nährlösungen, Anfangs-pH und Inkubationstemperatur wurden variiert. Die Ergebnisse von 14 Versuchen, die alle min-

destens 40 Tage unter Kontrolle standen, können wie folgt zusammengefaßt werden:

1. Kulturgefäße: In den 500-ml-Erlenmeyerkolben wird der Hemmstoff am schnellsten und in bester Ausbeute gebildet. Als ungünstiger erwiesen sich Glaxo-Gefäße mit 500 ml Nährlösung; mit 1000 ml Medium je Gefäß entstand überhaupt kein Hemmstoff mehr. Das gleiche negative Resultat erhielten wir bei Verwendung von 4-Liter-Schüttelgefäßen auf dem Schüttelturm, mit und ohne Belichtung.

2. Kulturart: Der Hemmstoff wird in Stand- und Schüttelkulturen gebildet. Die Zeitspanne bis zum Aktivitätsbeginn kann in Schüttelkultur 2 bis 3 Tage kürzer sein als in Standkultur; oftmals trat jedoch die Aktivität am gleichen Tage auf.

3. Nährlösungen und C-Quellen: Stamm M 3678 wurde auf folgenden Nährmedien geprüft:

a) Czapek-Nährlösung (siehe Kap. 1 § 2).

b) Weindling-Nährlösung [25 g Dextropur, 2,0 g $(CHOH \cdot COONH_4)_2$, 2,0 g KH_2PO_4, 1,0 g $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$, 1 ml vom Spurenelement-Konzentrat: 100 mg $FeSO_4$, 15 mg $CuSO_4$, 100 mg $ZnSO_4$, 10 mg $MnSO_4$, 10 mg $KMnO_4$, dest. Wasser ad 100 ml; ad 1000 ml aqua dest.].

c) Knop-Hefeextrakt-Nährlösung (siehe Kap. 1, § 2).

d) Czapek-Kartoffelsaft-Nährlösung (siehe Kap. 2, § 5 d).

e) Asparagin-Saccharose-Nährlösung (siehe Kap. 2, § 5 a).

Auf allen genannten Nährlösungen hat sich *Thielavia terricola* gut entwickelt, der Hemmstoff konnte jedoch nur im Czapek-Nährmedium nachgewiesen werden.

Im Versuch Nr. 6 wurde gleichzeitig mit der Bestimmung von Myzelgewicht und Wachstumsgeschwindigkeit die Abhängigkeit der biologischen Aktivität von der C-Quelle geprüft. Sofern die Kulturfiltrate das Bakterienwachstum hemmten, war die Wirkung in allen Fällen ungefähr gleich stark. Unterschiede fanden sich aber im Zeitpunkt des Aktivitätsbeginns. Das biologisch aktive Stoffwechselprodukt tritt auffallenderweise in den Lösungen mit sechswertigen Alkoholen (ausgenommen Mannit), mit Inulin und Galactose bereits nach 9 Tagen auf. In der Nährlösung mit Xylose konnten wir erst am 36. Tage eine geringe Aktivität feststellen. Der Beginn der Hemmstoffproduktion bei den übrigen Zuckern liegt zwischen diesen beiden Extremen. In der glycerinhaltigen Nährlösung blieb die biologische Aktivität aus.

4. Temperatur: Bei Inkubationstemperaturen unterhalb 27 °C und oberhalb 40 °C konnte der biologisch aktive Stoff nie nachgewiesen werden. Sofern die 37 °- und 40 °-Thermostaten mit 90 500-ml-Erlenmeyerkolben vollständig gefüllt waren, blieb die Bildung des Hemmstoffes aus, hingegen erschien er, wenn eine kleine Anzahl (5 bis 10 Kolben) inkubiert worden war, nach 8 bis 10 Tagen. Möglicherweise fehlte es im voll belasteten Thermostaten an genügend Sauerstoff.

Bei Großversuchen zur Gewinnung des Hemmstoffes erfolgte die Inkubation bei 30 °C in einem Brutraum von etwa 50 m³ Rauminhalt. Aktivität konnte nach 12 bis 14 Tagen festgestellt werden.

5. Wasserstoffionenkonzentration: Ausgangswerte zwischen pH 3 und 4 wirkten sich auf die Entwicklung des Hemmstoffes verlangsamend aus. Bei allen Stufen zwischen pH 5 und 8 erschien die Aktivität in einheitlicher Stärke nach 10 Tagen.

Für die Produktion des Hemmstoffes durch *Thielavia terricola* Stamm M 3678 erwiesen sich die folgenden der geprüften Bedingungen am günstigsten: Kultur des Pilzes in 500-ml-Erlenmeyerkolben auf Czapek-Nährlösung mit 3 % Zucker als Stand- oder Schüttelkultur zwischen 27 ° und 37 °C und Anfangs-pH-Werten von 5 bis 8.

§ 3 Isolierung der aktiven Stoffe

Aktives Kulturfiltrat und Myzel von Stamm M 3678 wurden getrennt aufgearbeitet.

a) Aufarbeitung der Kulturfiltrate

In Vorversuchen wurde festgestellt, daß sich der aktive Stoff bei neutraler oder schwach basischer Reaktion des Kulturfiltrates am besten durch dreimaliges Ausschütteln mit Essigester extrahieren läßt. Die wässerige Phase erwies sich nach dem Ausschütteln als inaktiv. Nach Trocknen mit Na_2SO_4 wurde der Essigester am Vakuum bei 50 °C eingedampft. Von 10 Liter Kulturfiltrat resultierten rund 300 mg Extrakt, in dem, auf Grund des Agar-Diffusionstestes, der aktive Anteil enthalten war.

b) Aufarbeitung des Myzels

Das Myzel wurde mit dest. Wasser gut ausgewaschen, anschließend im Mörser mit Pyrex-Glaspulver (Feinheitsgrad 300) zerrieben, mit bidest. Wasser versetzt (auf 200 g Myzel 500 ml) und eine Stunde lang bei 4 °C durchmischt. Die weitere Verarbeitung des mit Hilfe einer Porzellannutsche abgetrennten Extraktes erfolgte analog der unter a) beschriebenen Methode.

Die Myzelextrakte hemmten im Agar-Diffusionstest meist etwas mehr als die Extrakte der Kulturfiltrate. Relativ hohe Aktivität enthielten die Myzelextrakte, wenn die Kulturen kurz nach dem ersten Nachweis von Hemmwirkung im Filtrat geerntet wurden, und um so weniger, je später die Ernte erfolgte.

Die weitere Aufarbeitung der Extrakte einiger Großansätze führte Herr PD Dr. Tamm (Organisch-Chemische Anstalt der Universität Basel) durch. Es sei ihm an dieser Stelle der beste Dank ausgesprochen. Seine bisherigen Untersuchungen faßt er wie folgt zusammen:

„Kulturfiltrat und Myzel wurden getrennt untersucht. Es wurde hauptsächlich mit den Kulturfiltraten gearbeitet. Dabei ließ sich bisher eine merkliche Anreicherung des Wirkstoffes, jedoch noch keine Isolierung in reiner Form erzielen. Wir gingen in folgender Weise vor:

Das Kulturfiltrat wurde gründlich mit Essigester ausgeschüttelt. Die verbliebene wässerige Phase war biologisch unwirksam und wurde deshalb nicht weiter untersucht. In einem Vorversuch wurde dieser Essigesterextrakt bei

0 °C mehrmals mit 2 n HCl, dann mit 2 n NaOH und schließlich mit Wasser ausgeschüttelt. Der nach Trocknen über Na_2SO_4 und Eindampfen im Vakuum erhaltene Rückstand der Essigesterlösung zeigte noch die ursprüngliche biologische Aktivität, während weder die saure noch die alkalische Lösung wirksam waren. Daraus kann geschlossen werden, daß es sich bei dem oder den Hemmstoffen um einen oder mehrere Neutralstoffe von lipophilem Charakter handeln dürfte. In den Hauptversuchen wurden die Essigesterlösungen zur Abtrennung von biologisch unwirksamen sauren und basischen Begleitstoffen bei 0 °C nacheinander mit 0,5 n Essigsäure und gesättigter $KHCO_3$-Lösung durchgeschüttelt, über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Das erhaltene Rohprodukt wurde hierauf an der Silicagelsäule (SiO_2) chromatographiert. (Al_2O_3 hatte sich wegen der zu großen Haftfestigkeit der wirksamen Bestandteile als ungünstig erwiesen.) Die biologisch wirksamen Anteile befanden sich in den mit Chloroform-Methanol (99 : 1) eluierten Fraktionen.

Das Säulenchromatogramm führte zu einer 20fachen Anreicherung des aktiven Prinzips."

§ 4 Biologische Teste

Um die Wirkung des aktiven Stoffes (oder der aktiven Stoffe) näher zu charakterisieren, wurden folgende Teste durchgeführt:

a) Grosser-Test (Grosser und Friedrich 1947).
b) *Ustilago*-Test (Kobel 1951, Kern 1952).
c) Tomatenwelke-Test (Gäumann et al. 1950).
d) Algentest (nach Naef-Roth, nicht veröffentlicht).
e) Agar-Diffusionstest (siehe Kap. 3, § 1).

Frau Dr. St. Naef-Roth und ihren Mitarbeiterinnen danke ich bestens für die Ausführung der Teste.

Die ersten Extrakte, die geprüft wurden, stammten aus einem Versuch mit Glaxo-Gefäßen (Beschickung: 500 ml Czapek-Nährlösung mit 3 % Glukose), 36 Tage bei 30 °C inkubiert. Die Aufarbeitung von Myzel und Kulturfiltrat geschah nach der beschriebenen Methode. Als Testlösung wurde verwendet: 1 mg Extrakt je ml 5%ige Acetonlösung; pH 4,5.

Zwei weitere Extrakte wurden aus einem Versuch gewonnen, der mit 500-ml-Kolben und Czapek-Nährlösung mit 3 % Saccharose durchgeführt worden war. Die Inkubationstemperatur betrug 30 °C. Drei Wochen alte Reiskolbenkulturen lieferten wiederum das Ascosporenmaterial.

Zwei Tage nach Auftreten der Aktivität, d. h. nach 14 Inkubationstagen, erfolgte die Ernte. Im Gegensatz zum obenerwähnten Versuch zur Gewinnung des Hemmstoffes wurden Kulturfiltrat und Myzel vor der Aufarbeitung lyophilisiert. Die aus dem Kulturfiltrat stammenden Trockensubstanzen wurden in dest. Wasser (250 ml je 100 mg Lyophilisat) aufgenommen und mit Essigester extrahiert (vgl. § 2 a). Das Myzel enthielt, nachdem es zerrieben, in Wasser suspendiert und von der wässerigen Phase abgetrennt worden war, noch immer einen Teil der Aktivität. Es darf also angenommen werden, daß der aktive Stoff im Myzel schwerer wasserlöslich ist als derjenige im Kulturfiltrat. Diese Be-

obachtung läßt an eine Verschiedenheit der Hemmstoffe in Myzel und Kulturfiltrat denken.

Im Algentest wird das Wachstum von *Chlamydomonas eugametos* in verschiedenen Extraktverdünnungen während 4 Tagen beobachtet und bonitiert. In diesem Test wird die Hemmstoffkonzentration ermittelt, die das Wachstum der Algen auf die Hälfte reduziert (LD_{50}).

Die Ergebnisse des Glaxo- als auch des Erlenmeyer-Versuches sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11

Resultate der biologischen Teste

Test	Einheits-bezeichnung	Myzelextrakt		Kulturfiltrat-Extrakt	
		Glaxo	Erlen-meyer	Glaxo	Erlen-meyer
Grosser-Test	LD_{50} mg/ml	0,01	0,04	0,01	0,06
Ustilago-Test	LD_{50} mg/ml	> 1	> 1	0,04	0,25
Algen-Test	LD_{50} mg/ml		0,1		0,5
Agar-Diffusions-Teste:					
Bacillus subtilis	Hemmhof mm	13	12	9	9
Staphylococcus aureus	Hemmhof mm	14	12	11	10
Escherichia coli	Hemmhof mm	—		—	
Saccharomyces cerevisiae	Hemmhof mm	—		—	
Candida vulgaris	Hemmhof mm	—		—	
Tomatenwelke-Test, *dosis minima*	mg/kg	500	250	170	170

Obwohl die Bedingungen für die Kultur des Pilzes in beiden Versuchen verschieden waren, stimmen die in Tabelle 11 dargestellten Ergebnisse der biologischen Prüfung generell überein. Sie lassen folgende Interpretation zu:

Grosser-Test: Der Hemmstoff im Myzel und Kulturfiltrat der Glaxo-Kulturen wirkt gleich stark. Der Myzelextrakt aus den Erlenmeyerkulturen hemmt das Wachstum von *Rhizoctonia solani* Kühn etwas stärker. Das aktive Prinzip des Pilzes *Thielavia terricola* vermag demnach das Myzelwachstum des Testpilzes zu hemmen.

Ustilago-Test: Der Myzelhemmstoff zeigt keine Wirkung. Der Kulturfiltratextrakt aus den Glaxo-Gefäßen beeinträchtigt die Sporenkeimung von *Ustilago zeae* bedeutend mehr als das Erlenmeyerkulturfiltrat.

Algentest: Mit Glaxo-Kulturen nicht durchgeführt. Der Myzelextrakt aus den Kolben hemmt das Wachstum von *Chlamydomonas eugametos* stärker als der Kulturfiltratextrakt.

Agar-Diffusionsteste: Nur die Gram-positiven *Bacillus subtilis* und *Staphylococcus aureus* wurden gehemmt. Die biologische Aktivität ist bei beiden Kulturarten im Myzelextrakt größer als im Kulturfiltratextrakt.

Tomatenwelketest: Der Myzelextrakt bleibt wirkungslos. Die Filtratextrakte stimmen in ihrer Toxizität überein. Die *dosis minima* beider Extrakte liegt bei 170 mg/kg Lebendgewicht.

Die Gegensätzlichkeit zwischen Grosser-, *Ustilago*-, Welketest einerseits und Agar-Diffusionstest anderseits weist ebenfalls auf die Anwesenheit von mehr als einem biologisch aktiven Stoffwechselprodukt hin.

Die Wirkung des Giftstoffes im Kulturfiltrat auf die Tomatensprosse ist beinahe so stark wie diejenige der Fusarinsäure (*dosis minima:* 158 mg/kg, Gäumann et al. 1952).

Kapitel 4: Die Lebensgemeinschaft von *Thielavia* und *Thielaviopsis*

Das gemeinsame Vorkommen von *Thielavia* und *Thielaviopsis* warf die Frage nach den Beziehungen zwischen beiden Pilzen und der Wirtspflanze auf. Einigen Aufschluß darüber hofften wir aus den Resultaten von Mischkulturen (§ 1) und Mischinfektionen (§ 2) zu erhalten.

§ 1 Mischkulturen

Versuch Nr. 10: Wie verhalten sich *Thielavia* und *Thielaviopsis* in Mischkultur?

In diesem Versuch wurde je ein *Thielavia*- mit je einem *Thielaviopsis*-Stamm gemeinsam kultiviert; da je Gattung drei Stämme berücksichtigt werden sollten, ergaben sich neun Kombinationen, dazu sechs Monokulturen als Kontrollen. Als Medium diente Czapek-Kartoffelsaft-Nährlösung, je 100 ml in 500-ml-Erlenmeyerkolben. Die Gefäße für Einzelkulturen beimpften wir mit 1 ml Sporensuspension, diejenigen für zwei Organismen mit 0,5 ml Suspension jedes der beiden Stämme. Je Kombination und Einzelkultur wurden 5 Kolben bei 27 °C 34 Tage lang bebrütet, und für alle Misch- und Einzelkulturen erfolgte am Ende der Inkubationszeit die Bestimmung der Myzelgewichte.

Die Ausnützung der gebotenen Nährstoffe soll nach den Myzelgewichten (Abb. 7) beurteilt werden. Es sind jeweils zu vergleichen: Eine Einzelkultur *Thielavia* plus eine Einzelkultur *Thielaviopsis* mit zwei Kolben Mischkultur der gleichen Stämme.

Die Einzelgewichte liegen bei *Thielavia* wesentlich höher als bei *Thielaviopsis*.

Der Einfluß des simultanen Wachstums geht aus folgendem Beispiel hervor:

Thielavia M 3674	545 mg/1 Kolben	Mischkultur *Thielavia* M 3674
Thielaviopsis M 3622	144 mg/1 Kolben	und *Thielaviopsis* M 3622, 2 Kolben zu je 675 mg =
Summe	689 mg/2 Kolben	tot. 1350 mg.

Die Myzelproduktion war in den Mischkulturen nicht nur im obigen Beispiel, sondern auch in den anderen Kombinationen nahezu verdoppelt.

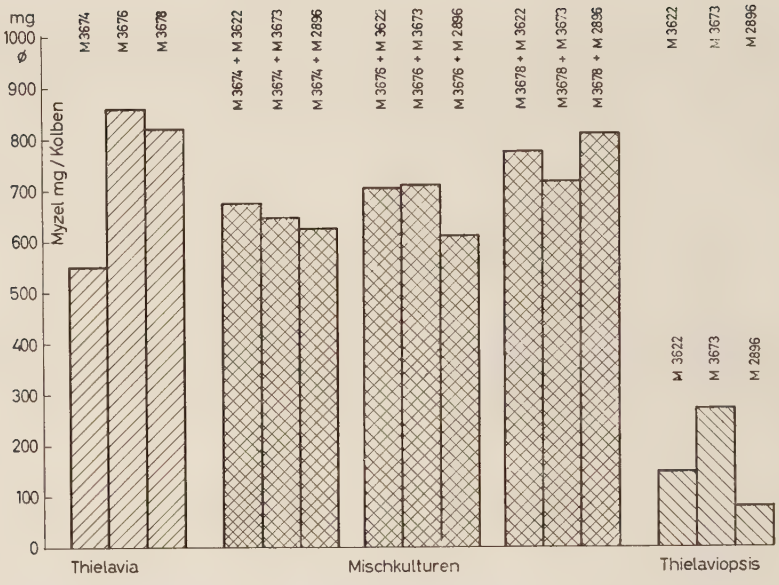

Abb. 7. Myzelgewichte von je drei *Thielavia*- und *Thielaviopsis*-Stämmen und ihren Mischkulturen

STOVER (1950 a) ließ die beiden Pilze gemeinsam auf einem Agarnährboden wachsen. Die schneller wachsende *Thielavia* überwucherte *Thielaviopsis*, jedoch wurden Anzeichen einer Unverträglichkeit oder Förderung nicht festgestellt.

Mischkulturen enthielten mehr Perithecien als *Thielavia*-Einzelkulturen. Über gleiche Erfahrungen berichteten MCCORMICK (1925) und STOVER (1950 a). Die Entwicklung der Hauptfruchtform soll jedoch auch durch andere Pilze, ihre Kulturfiltrate und Pilzextrakte gefördert werden. Nach unseren Beobachtungen fruktifizieren die meisten *Thielavia*-Stämme auf Malz-Hefeextrakt-Agar (je 20 g Malz- und Hefeextrakt, 20 g Agar, aqua dest. ad 1000 ml) sehr gut.

§ 2 Infektionsversuche

Die Pathogenität von *Thielavia* und *Thielaviopsis* für Tabak sollte mit Einzel- und Mischinfektionen geprüft werden. 240 glasierte Tontöpfe (Inhalt je 6 Liter) wurden mit dampfsteriler Humuserde gefüllt und auf 24 Wassertröge im Gewächshaus verteilt. Je 4 Tröge konnten auf konstante Temperaturen von 20 ° und 30 °C eingestellt werden. Die restlichen 160 Töpfe standen unter dem Einfluß der Raumtemperatur, die während des Versuches (März/April/Mai) zwischen 18 ° und 25 °C schwankte; die Differenzen in der Humuserde waren allerdings bis auf Extreme von 20 ° und 23 °C gedämpft.

In jedem Topf wurde eine 5 Wochen alte Tabakpflanze der wurzelfäuleanfälligen Sorte White Burley SOTA piquiert. Für die Überlassung des Saatgutes danken wir Herrn Dr. HUTER (SOTA, Lausanne) an dieser Stelle bestens.

Abb. 8 (oben). Mit Mischkultur *Thielavia terricola* (M 3678) und *Thielaviopsis spec.* (M 3622) infizierte Tabakpflanzen der Sorte White Burley SOTA. Bodentemperatur: 20 °C. Kontrollen rechts außen. 1/20 nat. Größe. Aufn.: Dr. Ch. Stoll

Abb. 9 (unten). Mit der gleichen Mischkultur wie auf Abb. 8 infizierte Tabakpflanzen. Bodentemperatur: 30 °C. Kontrollen rechts außen. 1/20 natürl. Größe. Aufn.: Ch. Stoll

Der Versuch umfaßte 11 *Thielavia*-, 5 *Thielaviopsis*-Stämme und Mischkulturen. Je Stamm und Mischkultur war ein Trog (10 Töpfe) vorgesehen, 8 Töpfe für die Infektion und 2 Töpfe für die Kontrolle. *Thielaviopsis*-Stamm M 3622 wurde mit je einem von 4 *Thielavia*-Stämmen (*Thielavia basicola* M 3676, *Thielavia Sepedonium* M 3674, *Thielavia terricola* M 3653 und M 3678) für Versuche bei 20 ° und 30 °C Bodentemperatur gemischt. Je Topf gelangten 25 ml Sporensuspension zur Anwendung, d. h. ein Sporulierkolben genügte für die Infektion von 4 Töpfen. Das Sporuliermaterial wurde mit 500 ml Leitungswasser verdünnt und zu den Pflänzchen gegossen. Für die Mischinfektion verwendeten wir Sporenmaterial der beiden Stämme im Verhältnis 1 : 1 und impften von dieser Mischung je 25 ml je Topf.

14 Tage nach Zugabe der Sporensuspensionen konnten bereits die ersten Schädigungen in den mit *Thielaviopsis* und mit Mischkulturen infizierten Töpfen festgestellt werden. Die Abbildungen 8 bis 13 zeigen die Pflanzen 23 Tage nach der Infektion.

Abb. 10 (oben). Mit *Thielaviopsis spec.* (M 3622) infizierte Tabakpflanzen bei Raumtemperatur. Kontrollen links außen. 1/20 nat. Größe. Aufn.: CH. STOLL

Abb. 11 (unten). Mit *Thielavia terricola* (M 3678) infizierte Tabakpflanzen bei Raumtemperatur. Kontrollen links außen. 1/20 nat. Größe. Aufn.: CH. STOLL

Ergebnisse:

1. Nur in den mit *Thielaviopsis* oder Mischkulturen infizierten Töpfen mit einer Bodentemperatur unterhalb 25 °C trat die Wurzelfäule auf.
2. Bei einer konstanten Bodentemperatur von 20 °C (Abb. 8) erkrankten die Tabakwurzeln rascher und mehr als bei schwankender Raumtemperatur (Abb. 10).
3. Mikroskopische Untersuchungen von kranken Wurzeln zeigten, daß sich eine große Zahl Chlamydosporen im Zentralzylinder gebildet hatte. Perithecien von *Thielavia* konnten auch innerhalb der Korkschicht beobachtet werden (vgl. STOVER, 1950 a).

Wir teilen mit STOVER (1950 a) die Auffassung, wonach eine erhöhte Perithecienbildung nicht unbedingt auf einen symbiontischen Zusammenhang zwischen den beiden Pilzen hinweisen muß. Das Fehlen von Perithecien auf mit *Thielavia* allein infizierten Tabakwurzeln läßt immerhin vermuten, daß sich *Thielavia* hauptsächlich auf bereits mit *Thielaviopsis* infizierten Wirten entwickelt.

ALLISON (1938) und RAWLINGS (1940) fanden auf Tabak physiologische Rassen von *Thielaviopsis basicola* mit unterschiedlicher Virulenz. STOVER

(1950 a) unterteilte *Thielaviopsis basicola* in zwei Formen, von denen die „graue" weniger pathogen sein sollte als die „braune".

Zwei Wiederholungen des Infektionsversuches unter anscheinend gleichen Verhältnissen führten zu keinem positiven Resultat. Der Verdacht einer Virulenzeinbuße des pathogenen Pilzes lag nahe. Deshalb wurde ein Infektionsversuch unter vollständig sterilen Bedingungen angesetzt.

Abb. 12. Pflanze rechts: Mit Mischkultur *Thielavia terricola* (M 3678) und *Thielaviopsis spec.* (M 3622) infizierte Tabakpflanze. Bodentemperatur: 20 °C. Pflanze links: Kontrolle. 1/5 nat. Größe

Abb. 13. Pflanze rechts: Mit Mischkultur *Thielavia terricola* (M 3653) und *Thielaviopsis spec.* (M 3622) infizierte Tabakpflanze bei Raumtemperatur gewachsen. Pflanze links: Kontrolle. 1/5 nat. Größe

Versuch Nr. 11: Welchen Einfluß haben *Thielavia*, *Thielaviopsis* und deren Mischkulturen auf steril gewachsene Tabakpflänzchen?

Pillengläser (30 mm ⌀, 80 mm hoch) wurden bis zu einem Drittel mit ausgeglühtem Quarzsand und Knop-Nährlösung gefüllt. Der Flüssigkeitsspiegel durfte nicht höher sein als der Sand. Die Gläschen wurden mit einem Wattepfropfen verschlossen und autoklaviert.

Den Tabaksamen beizten wir 30 Minuten in 1%igem Javelle-Wasser. Ein G-4-Glasfilter diente zum dreimaligen Auswaschen mit sterilem dest. Wasser. Mit einer Pipette wurden im Impfkasten aus der Samenaufschwemmung 5 bis 10 Sämlein aufgenommen und auf den Sand in die Gläser übertragen. Die Inkubation erfolgte bei 23 °C im Gewächshaus.

Nach 15 Tagen waren die Pflänzchen 1 bis 2 cm groß. In diesem Stadium erfolgte die Infektion mit je 3 *Thielavia*- und *Thielaviopsis*-Stämmen sowie

Abb. 14. Totalansicht eines Kontrollgläschens; Tabakpflanzen (Sorte White Burley SOTA) 45 Tage alt. Nat. Größe. Aufn.: Photographisches Institut ETH

Abb. 15. Steriler Infektionsversuch: Tabakpflanzen 45 Tage alt. Rechts: Mit *Thielavia terricola* (M 3678) infizierte Pflanzen; links: Kontrolle. Nat. Größe. Aufn.: Photographisches Institut ETH

Abb. 16. Steriler Infektionsversuch: Tabakpflanzen 45 Tage alt. Rechts: Mit Mischkultur *Thielavia terricola* (M 3678) und *Thielaviopsis spec.* (M 3622) infizierte Pflanzen; links: Mit *Thielaviopsis spec.* (M 3622) allein infizierte Pflanzen. Nat. Größe. Aufn.: Photographisches Institut ETH

deren Gemisch. Je Einzel- und Mischinfektion standen 10 Röhrchen zur Verfügung, die mit je 1 ml Sporensuspension beimpft wurden, zudem 20 Gläser für die Kontrollen. Jede Woche führten wir den Pflänzchen mit einer Injektionsspritze steriles Wasser zu. Abbildung 14 zeigt die Totalaufnahme eines Kontrollgläschens.

Resultate: Nach 15 Tagen erschienen die ersten Krankheitssymptome bei den mit *Thielaviopsis* allein infizierten Pflanzen. 10 Tage später begannen auch bei den Mischinfektionen die Tabakblättchen zu vergilben. Am 30. Inkubationstag waren bei 2 *Thielaviopsis*-Stämmen (M 3622 und M 2896) die Tabakpflänzchen abgestorben; bei Stamm M 3673 standen noch einige chlorotische Keimlinge.

Die mit *Thielavia* allein infizierten Pflanzen gediehen gleich gut wie die Kontrollen.

In den Mischinfektionsgläschen setzten die Krankheitszeichen später und weniger intensiv ein als in den mit *Thielaviopsis* infizierten Gefäßen. Bei der Mischinfektion war nur die Hälfte Konidien des pathogenen Pilzes geimpft worden.

Unter dem Mikroskop ließen sich dieselben Erscheinungen wie beim Infektionsversuch in den Tongefäßen erkennen.

Die Virulenz des pathogenen Pilzes hatte eventuell etwas nachgelassen, jedoch war sie noch vorhanden.

Diskussion

Ein Überblick über die Literatur (Abschnitte I und II) zeigt, daß *Thielavia basicola* Zopf und *Thielaviopsis basicola* (B. et Br.) Ferr. zwei verschiedene Pilze sind. In abweichenden Temperatur- und Nährstoffansprüchen (Kap. 2, §§ 2 und 5) trat dies auch bei Kulturversuchen deutlich in Erscheinung.

Dem beobachteten gemeinsamen Vorkommen in der Natur entspricht die im Experiment festgestellte Verträglichkeit. In Mischkulturen (Kap. 4, § 1) erfolgt sogar eine Förderung; sie wird allerdings nur auf einer Seite, nämlich als vermehrte Perithecienbildung bei *Thielavia*, augenfällig. Die Stimulation ist jedoch nicht an *Thielaviopsis* gebunden, sondern manche Pilzextrakte (und Hefeextrakt) wirken im gleichen Sinne (vgl. McCormick 1925). Man könnte sich einen ähnlichen Einfluß durch Stoffwechselprodukte des Wirtes vorstellen. Trotzdem ist das Zusammenleben der beiden Pilze unter saprophytischen Bedingungen mit Einschränkungen als Symbiose zu bezeichnen.

Diese Lebensgemeinschaft hat jedoch keine — wenigstens keine erkennbare — Bedeutung für das Zustandekommen des Krankheitsbildes. *Thielaviopsis* allein ist voll infektionstüchtig und löst die Symptome aus. Toxinbildung konnte bei diesem Pilz mit unseren Testmethoden nicht festgestellt werden.

Der von der nicht pathogenen *Thielavia* gebildete Hemmstoff (oder eines ihrer Toxine) wirkt auf Tomatensprosse als Welkegift; ein Einfluß auf die

Wurzelbräune ist aber aus zwei Gründen unwahrscheinlich: Erstens wurden Tabakpflanzen durch aktive Kulturfiltrate nicht geschädigt. Zweitens tritt die biologische Aktivität nur unter spezifischen Kulturbedingungen auf; sie bleibt vor allem in Nährlösungen mit undefinierten Stoffen wie Kartoffelsaft oder Hefeextrakt aus. Möglicherweise wirken Spurenelemente oder Vitamine der Hemmstoffproduktion entgegen; das könnte auch unter natürlichen Bedingungen der Fall sein.

In der Gattung *Thielavia* fielen neben der biologischen Aktivität eines Stammes einige physiologische Daten besonders auf, so die Verträglichkeit extrem hoher Zuckerkonzentrationen (bis 48 % Saccharose) und das hohe Temperaturoptimum. Bestes Wachstum bei 37 ° bis 42 °C weist auf die ursprüngliche Herkunft des Pilzes hin: tropische und subtropische Gebiete. Dieser optimale Temperaturbereich entspricht weitgehend den Wärmeansprüchen von tier- und humanpathogenen Pilzen, z. B. Ascomyceten aus der *Aspergillus*-Gruppe. Der Human- und Veterinärmedizin ist jedoch keine durch *Thielavia* hervorgerufene Krankheit bekannt.

Zusammenfassung

1. Auf Grund von entwicklungsgeschichtlichen und physiologischen Untersuchungen ist erwiesen, daß *Thielavia* und *Thielaviopsis* zwei verschiedene Pilze sind.

2. Das Wachstumsoptimum von *Thielavia* liegt *in vitro* zwischen 33 ° und 42 °C.

3. Alle Stämme der Gattung *Thielavia* stellen an die Ernährung weitgehend gleiche Ansprüche. Sie scheinen vollständig autotroph in bezug auf Wuchsstoffe zu sein. Als C-Quellen dienen verschiedene Mono-, Di-, Tri- und Polysaccharide sowie Alkohole. Nitrat-, Ammon- und organischer Stickstoff werden verwertet.

4. *Thielaviopsis* benötigt vorwiegend organischen Stickstoff

5. Es konnte ein *Thielavia terricola*-Stamm mit biologischer Aktivität *in vitro* gefunden werden. Die Toxizität wurde in verschiedenen biologischen Testen geprüft. Die unterschiedlichen Resultate lassen vermuten, daß es sich um mehr als ein biologisch aktives Stoffwechselprodukt handelt.

6. *Thielaviopsis* bildet *in vitro* keine mit unseren Testmethoden erfaßbaren Toxine.

7. In Mischkulturen mit *Thielavia* und *Thielaviopsis* wird das Myzelgewicht erhöht; besonders augenfällig ist die vermehrte Perithecienbildung von *Thielavia*.

8. Infektionsversuche auf Tabak verliefen mit *Thielavia* negativ, mit *Thielaviopsis* dagegen positiv. Die durch *Thielaviopsis* allein oder Gemische von *Thielavia* und *Thielaviopsis* bedingte Erkrankung führte zu keinen wesentlichen Unterschieden im Schadbild.

Summary

1. It has been established beyond doubt by cultural experiments that *Thielavia* and *Thielaviopsis* have no genetic connection.

2. The optimum temperature for *in vitro* growth of *Thielavia* lies between 33 ° and 42 °C.

3. The most favorable initial pH for the development of *Thielavia* lies between 3,9 and 6,0. Lucas (1955) found the same optimal range for *Thielaviopsis*.

4. Light has no influence on the growth of *Thielavia*. When grown in the dark, *Thielavia Sepedonium* produces a yellow pigment which makes it possible to distinguish this species from the other species of *Thielavia*.

5. *Thielavia* grows equally well on synthetic and natural media. Mono-, di-, tri- and polysaccharides as well as various alcohols can be used as carbon sources.

6. *Thielavia* can use nitrogen from nitrates, ammonium salts and organic compounds, while *Thielaviopsis* mainly needs organic nitrogen.

7. One strain of *Thielavia terricola* was found to produce a biologically inhibitory principle in its cultures. No such principle has been detected in cultures of *Thielaviopsis*.

8. The toxicity of the active substance or substances was checked by various biological tests. The presence of more than one biologically active substance is suggested by differing results.

9. Experiments with mixed cultures have shown that *Thielaviopsis* stimulates the formation of perithecia of *Thielavia*.

10. Experiments on the infection of tobacco were negative with *Thielavia* and positive with *Thielaviopsis*. There is no difference in the damage caused by *Thielaviopsis* alone and a mixture of *Thielavia* and *Thielaviopsis*.

Literaturverzeichnis

Abrams, E., 1950: Microbiological deterioration of cellulose during the first 72 hours of attack. Text. Res. J. **20**, 71—86.

Allison, C. C., 1938: Physiologic specialisation of *Thielaviopsis basicola* on tobacco. Phytopathology **28**, p. 1.

Barnett, H. L., V. G. Lilly and B. M. Waters, 1953: The effects of temperature and method of sugar sterilization on growth of *Thielaviopsis basicola*. Proc. W. Va. Acad. Sci. **25**, 27—28.

Berkeley, M. J., and C. E. Broom, 1850: Notices of British fungi. Ann. Mag. Nat. Hist. II, **5**, 461.

Bliss, C. I., 1944: Relative potency as applied to the assay of Penicillin. Science **100**, 577.

Böning, K., 1935: Versuche zur Bekämpfung von Keimlingskrankheiten und Wurzelbrand des Tabaks in den Anzuchtbeeten mit chemischen Mitteln. Z. Pfl. Krankh. **45**, 385—415.

Bordeleau, R., 1934: The black rot of tobacco in the Province of Quebec. Rep. Quebec Soc. Prot. Pl. 1932—1934, 135—139.

Brierley, W. B., 1915: The endoconidia of *Thielavia basicola* Zopf. Ann. Bot. **29**, 483—493.

CAPPELLUTI-ALTOMARE, G., 1902: I semenzai del Tabacco e la *Thielavia basicola* Zopf. R. Inst. Scafati, 137—147.

CHATTOPADHYAY, S. B., and C. DAS GYPTA, 1957: *Thielavia indica* sp. nov. Trans. Brit. Myc. Soc. **40**, 277.

CLINTON, G. P., 1906: Root rot of tobacco, *Thielavia basicola* (B. et Br.) Zopf. Conn. Agr. Exp. Sta. Ann. Rept. 1906, 342—368.

— —, 1908: Report of the Botanist 1907. Conn. Agr. Exp. Sta. Rept. 1907, 363—368.

Code international de la Nomenclatur Botanique, 1956, Utrecht.

CONANT, G. H., 1927: Histological studies of resistance in tobacco to *Thielavia basicola*. Am. J. Bot. **14**, 457—480.

DADANT, R., 1950: Sur une nouvelle maladie du *Coffea robusta* en Nouvelle-Calédonie. Rev. gén. Bot. **57**, 168—176.

DADE, H. A., 1928: *Ceratostomella paradoxa*, the perfect stage of *Thielaviopsis paradoxa* (de Seynes) v. Höhnel. Trans. Brit. Myc. Soc. **13**, 184—194.

DOGUET, G., 1956: Le genre *Thielavia* Zopf. Rev. Myc. **21**, Suppl. col. No. 1.

DORAN, W. L., 1929: Effects of soil temperatures and reaction on growth of tobacco infected and uninfected with root rot. J. Agr. Res. **39**, 853—872.

DUGGAR, B. M., 1909: Fungous Diseases of Plants. Boston.

EMMONS, C. W., 1930: *Coniothyrium terricola* proves to be a species of *Thielavia*. Bull. Torr. Bot. Club **57**, 123—126.

— —, 1932: The development of the ascoscarp in two species of *Thielavia*. ibid. **59**, 415—422.

FERRARIS, T., 1912: Hyphales. Soc. Bot. Ital. Flora Ital. Crypt. **1**, 233.

FISCHER, E., und E. GÄUMANN, 1929: Biologie der pflanzenbewohnenden parasitischen Pilze. Jena.

FOËX, E., 1910: Maladie du pied de la violette. Ann. Ec. Nat. Agr. Montpellier n. s. **10**, 165—171.

GÄUMANN, E., 1994: Die Pilze, Grundzüge ihrer Entwicklungsgeschichte und Morphologie. Basel.

— —, 1951: Pflanzliche Infektionslehre. 2. Aufl. Basel.

— —, ST. NAEF-ROTH und G. MIESCHER, 1950: Untersuchungen über das Lycomarasmin. Phytopath. Z. **16**, 257—288.

— —, — — und H. KOBEL, 1952: Über Fusarinsäure, ein zweites Welketoxin des *Fusarium lycopersici* Sacc. ibid. **20**, 1—38.

GILBERT, W. W., 1909: The root rot of tobacco caused by *Thielavia basicola*. US Dept. Agr. Bur. Pl. Ind. Bul. **158**, 1—48.

GILMORE, L. E., 1947: The role of calcium, phosphorus, sulphur and superphosphate for tobacco. Sci. Agr. **17**, 21—32.

GROOSHEVOY, S. E., 1939: Disinfection of seed-bed soil in cold frames by solar energy. The Mikoyan pan-Soviet sci. Res. Inst. Tob. and Indien Tob. Ind. (VITIM), Krasnodar, Publ. 137, 51—56 (Engl. summary).

— —, and P. M. LEVYKH, 1936: Effect of soil temperature and moisture on the development of the principal disease of tobacco seedlings. ibid. Publ. 127, 5—18 (Engl. summary).

GROSSER, A., und W. FRIEDRICH, 1947: Eine Testmethode zur Bestimmung von Pilzhemmstoffen. Z. Naturf. **2 b**, 425—427.

HAYNES, W. C., L. J. WICKERHAM and C. W. HESSELTINE, 1955: Maintenance of cultures of industrially important Microorganisms. Appl. Microb. **3**, 363.

HENDERSON, R. G., 1941: Treatment of Tobacco plant bed soil with nitrogenous fertiliziers. Agr. News Lett. 1941, **9**, 72—78.

v. HÖHNEL, F., 1904: Zur Kenntnis einiger Fadenpilze. Hedwigia **43**, 297.

HOPKINS, J. C. F., 1956: Tobacco diseases. Kew, Surrey.

HUTER, R., 1954: Les ennemis du tabac. Communication No. 18 du centre de recherches et d'orientation de la SOTA, Lausanne.

— —, et A. SAVARY, 1953: La pourriture des racines du Tabac. Rev. romande Agric. **9**, 39—41.

Jewett, F. L., 1938: Relation of soil temperature and nutrition to the resistance of tobacco to *Thielavia basicola* Zopf. Bot. Gaz. **100**, 276—297.

Johnson, J., and R. E. Hartmann, 1919: Influence of soil environment on the root-rot of tobacco. J. Agr. Res. **17**, 41—86.

Jones, L. R., J. Johnson and J. G. Dickson, 1926: Wisconsin studies upon the relation of soil temperature to plant disease. Wisc. Agr. Exp. Sta. Res. Bull. **71**.

Keller, J. R., and J. B. Shanks, 1955: Poinsettia root-rot. Phytopathology **45**, 552—558.

Kern, H., 1952: Über die Beziehungen zwischen dem Alkaloidgehalt verschiedener Tomatensorten und ihrer Widerstandsfähigkeit gegen *Fusarium lycopersici* Sacc. Phytopath. Z. **19**, 351—382.

Kightlinger, C. V., 1946: Black rootrot resistant strains of Havana seed Tobacco for the Connecticut Valley. Bull. Mass. Agr. Exp. Sta. **432**, 1—20.

Klein, G., 1932: Handbuch der Pflanzenanalyse. 2. Band, Spez. Analyse. Wien.

Klein, P., 1957: Bakteriologische Grundlagen der chemotherapeutischen Laboratoriumspraxis. Berlin—Göttingen—Heidelberg.

Klemme, D., G. A. Greathouse, K. Bollenbacher and S. Pope, 1945: The deterioration of Cotton fabric by certain microorganisms. Circ. US Dep. Agr. **737**.

Kobel, F., 1951: Untersuchungen über toxische Stoffwechselprodukte von *Nectria cinnabarina* (Tode) Fr. Phytopath. Z. **18**, 157—195.

Levykh, P. M., 1939: Effect of soil temperature, moisture and reaction on the development of tobacco root rot. The A. J. Mikoyan pan-Soviet sci. Res. Inst. Tob. and Indien Tob. Ind. (VITIM), Krasnodar, Publ. 137, 3—12 (Engl. summary).

Lilly, V. G., and H. L. Barnett, 1951: Physiology of the Fungi. New York.

Lucas, G. B., 1948: Comparative cultural studies with *Thielavia basicola* and *Thielaviopsis basicola*. Phytopathology **38**, 16 (Abstr.).

— —, 1949: Studies on the morphology and cytology of *Thielavia basicola* Zopf. Mycologia **41**, 553—560.

— —, 1955: The cardinal temperature and pH reponse of *Thielaviopsis basicola*. ibid. **47**, 793—798.

McCormick, F. A., 1925: Perithecia of *Thielavia basicola* Zopf in culture and the stimulation of their production by extracts from other fungi. Conn. Agr. Exp. Sta. Bull. **269**, 539—554.

Melin, E., and J. A. Nannfeldt, 1934: Researches into blueing of ground woodpulp. Särtryck ur Svenska Skogsvardsföreningens Tidskrift, Hälfte 3, 4.

Mooi-Bok, M. B., 1952: Het *Thielaviopsis* wortelrot van *Lathyrus odoratus* L. (bodem moeheid). Meded. Plziektk. Ouderz. Wageningen **48**.

Moreau, C., 1952: Coexistence des formes *Thielaviopsis* et *Graphium* chez une souche de *Ceratocystis major* (van Beyma) nov. comb. Remarques sur les variations des *Ceratocystis*. Rev. Myc. **17**, Suppl. col. No. 1, 17—25.

Müller, H., 1955: Versuche zur Bekämpfung von *Thielavia basicola* Zopf. Z. Pfl. Krankh. **62**, 193—207.

Nicholas, D. J. D., and A. H. Fielding, 1951: The use of *Aspergillus niger* (M) for the determination of magnesium, zinc, copper and molybdenum available in soil to crop plants. J. Hort. Sci. **26**, 125—147.

Osmun, A. V., 1933: Departement of Botany, Ann. Rept. Mass. Agr. Exp. Sta. Bull. **293**, 15—21.

Paclt, J., 1951: A nomenclatorial discussion of *Thielavia basicola*. Parasitica **7**, 109—110.

Paech, K., and M. V. Tracey, 1955: Modern method in Plant Analysis. Vol. 2, Berlin.

Peters, L., 1921: Zur Biologie von *Thielavia basicola* Zopf. Mitt. d. Biol. Reichsanstalt **13**, 63—74.

Rawlings, R. E., 1940: Observation on the cultural and pathogenic habits of *Thielaviopsis basicola* (Berk. et Br.) Ferr. Ann. Miss. Bot. Gard. **27**, 561—598.

Reddick, D., 1913: Diseases of the violet. Mass. Hort. Soc. Trans. 1913, 85—102.

Robbins, W. J., 1937: The assimilation by plants of various forms of nitrogen. Am. J. Bot. **24**, 243—250.

Saccardo, P. A., 1886: *Clasterosporium fragile* (Sorok.) Sacc. Sacc. Syll. F. 4, 386.

Saraswathi Devi, L., 1954: Bio-assey of heavy metals by *Aspergillus niger* sensivity of a new strain. Proc. Ind. Akad. Sci. 40, Sec. B.

Sattler, F., 1936: Zur Biologie von *Thielavia basicola* (Berk. et Br.) Zopf. Phytopath. Z. 9, 1—52.

Schaffnit, E., und K. Meyer-Hermann, 1930: Über den Einfluß der Bodenreaktion auf die Lebensweise von Pilzparasiten und das Verhalten ihrer Wirtspflanzen. Phytopath. Z. 2, 99—166.

Sempio, C., 1934: Azione di alcuni metalli a distanza per contatto ed in soluzione sullo sviluppo della *Thielavia basicola* Zopf e su altri parasitti. Riv. Pat. veg. 24, 413—491.

de Seynes, J., 1886: Recherche Veget. Inf. III, p. 30, Taf. I, fig. 22—24.

Shanks, J. B., and J. R. Keller, 1954: Low pH joins sanitation measures in fight on Poinsettia root rot. Flor. Exch. Hort. Trade world 1.

Sorauer, P., 1895: Über die Wurzelfäule der Cyclamen. Z. Pfl. Krankh. 5, 18—20.

Sorokin, N., 1876: Über *Helminthosporium fragile* sp. n. Hedwigia 15, 113.

Steinberg, R. A., 1950 a: Growth on synthetic nutrient solutions of some fungi pathogenic to tobacco. Am. J. Bot. 37, 711—714.

— —, 1950 b: Growth of fungi in synthetic nutrient solutions. Bot. Rev. 16, 208—228.

Stoll, Ch., 1954: Über Stoffwechsel und biologisch wirksame Stoffe von *Gibberella fujikuroi* (Saw.) Woll., dem Erreger der Bakanaëkrankheit. Phytopath. Z. 22, 233—274.

Stover, R. H., 1950 a: The black root-rot disease of tobacco. Studies on the causal organism *Thielaviopsis basicola*. Canad. J. Res. Sect. C. Bot. Sci. 28, 445—470.

— —, 1950 b: The black root-rot disease of tobacco. Physiologic specialization of *Thielaviopsis basicola* on *Nicotiana tabacum*. Canad. J. Res. 28, 726—738.

— —, 1956 a: Effect of nutrition on growth and chlamydospore formation in brown and gray cultures of *Thielaviopsis basicola*. Canad. J. Bot. 34, 459—472.

— —, 1956 b: Behavior of albinism in brown and gray cultures of *Thielaviopsis basicola*. ibid. 34, 875—879.

Teorell, T., und E. Stenhagen, 1939: Teorell- und Stenhagen-Universalpuffer. B. Z. 299, 417.

Thaxter, R., 1892: Fungus in violet roots. Conn. Agr. Exp. Sta. Rept. 1891, 166—167.

Thom, Ch., and K. B. Raper, 1945: A manual of the *Aspergilli*. Baltimore.

Thomas, E. A., 1939: Über die Biologie von Flechtenbildnern. Beitr. Krypt.flora d. Schweiz 9 (1), 1—208.

Tiddens, B. A., 1933: Wortelrot van *Primula obconica* veroorzaakt door *Thielaviopsis basicola* (Berk. et Br.) Ferr. Thesis, Univ. Utrecht, Hollandia Drukkerij, Baarn.

Viennot-Bourgin, G., 1949: Les champignons parasites des plantes cultivées. Paris.

Wakefield, E. M., and W. C. Moore, 1936: Notes on certain changes in nomenclature in the second edition of the list of common names of British plant disease. Trans. Brit. Myc. Soc. 20, 97—109.

Waksman, S. A., and C. H. Reilly, 1945: Agar-streak method for assaying antibiotic substances. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 17, 556—558.

Wensley, R. N., 1953: Microbiological studies of the action of some selected soil fumugants. Canad. J. Bot. 31, 277—308.

Went, F. A. F. C., 1893: De Ananasziekte von het suikerriet. Archief voor de Java Suikerind. Soerabaia, p. 4, Taf. 3.

White, W. L., R. T. Darby, G. M. Stechert and K. Sanderson, 1948: Assays of cellulolytic activity of molds isolated from fabrics and related items exposed in the tropics. Mycologia 40, 34—84.

Zopf, W., 1876: Über eine neue pathologische Erscheinung auf *Senecio elegans*. Verhandl. Bot. Verein Prov. Brandenburg, 101—105.

Biologische Zentralanstalt
der Deutschen Akademie der Landwirtschaftswissenschaften zu Berlin
Institut für Phytopathologie, Naumburg (Saale)

Untersuchungen über die Gallbildung und Nekrosereaktion der Rebensorten unter Berücksichtigung der Rassendifferenzierung der Reblaus

Von

G. Schäller

Mit 10 Abbildungen

Inhalt: 1. Einführung. — 2. Material und Methode. — 3. Versuchsergebnisse. — 4. Besprechung der Ergebnisse. — Zusammenfassung. — Summary. — Literaturverzeichnis.

1. Einführung

Die züchterische Bekämpfung der Reblaus stützt sich auf die Unanfälligkeit oder Widerstandsfähigkeit bestimmter Rebensorten gegen diesen Schädling. Eine Rebensorte gilt im allgemeinen als resistenzzüchterisch wertvoll, wenn sie der Reblaus keine oder nur mangelhafte Ernährungs- und Fortpflanzungsmöglichkeiten bietet. Ein unmittelbarer Ausdruck des Resistenz- bzw. Anfälligkeitsgrades ist die Nekrosereaktion oder die Größe der Reblausgallen. Die Beziehung — je größer die Galle, desto geringer die Resistenz — besitzt zumindest für die Blattgalle volle Gültigkeit, während an der Wurzel durch die unterschiedliche Neigung des Gallengewebes der Rebensorten zu sekundären Fäulnisprozessen diese Beziehung verwischt wird.

Für eine zielstrebige Züchtungsarbeit ist die Kenntnis der Ursachen der unterschiedlichen Befallsreaktion unentbehrlich, ergibt sich doch daraus der einzuschlagende Züchtungsweg. Aus diesem Grunde interessierte dieses Problem schon seit Beginn der züchterischen Bekämpfung der Reblaus. Neben morphologisch-anatomischen Resistenzfaktoren waren vor allem in den letzten Jahren die physiologischen Ursachen von Befall und Nichtbefall in steigendem Maße Gegenstand der Forschung, nachdem das Problem durch

verfeinerte analytische Methoden experimentell zugänglich wurde (ANDERS 1957 a und b, BLAGOWESTSCHENSKI 1955, HENKE 1958, HOPP 1955, KLOFT 1951 a und b, KOSTIK 1954, NYSTÉRAKIS 1946 u. a.).

Seit den Untersuchungen von BÖRNER (1910, 1923, 1924) über die Reblausrassen kann man sich dieses Wirt-Parasit-Verhältnis so vorstellen, daß sich Rebensorten und Reblausrassen als zwei variable Reihen gegenüberstehen. Die Rebensorten variieren in der Reblausresistenz und die Reblausrassen im Angriffsvermögen auf ihre Wirtspflanzen. Erfolgt der Angriff der Reblausrassen auf die Rebensorten, so können die ausgelösten Wechselbeziehungen zum Befall der Reben unter Gallbildung oder über mannigfache Abstufungen zum Nichtbefall unter Nekrosereaktion führen. Dieses genetisch festgelegte Reaktionsvermögen der Rebensorten (das unter dem Einfluß innerer und äußerer Faktoren Schwankungen unterworfen ist, die jedoch nur ausnahmsweise für Befall oder Nichtbefall ausschlaggebend sind) trifft jedoch offenbar nur für Normalgewebe der Reben zu. BÖRNER (1949) beobachtete, daß Rebläuse, auf deren Einstich eine Rebensorte normalerweise mit Nekrosebildung reagiert, auf der gleichen Rebe zur Entwicklung und mehr oder weniger gehemmten Eiablage kommen, sobald sie in oder an Blatt- oder Wurzelgallen einer anderen Reblausrasse saugen.

Diese mehr zufällige Beobachtung BÖRNERS sollte an einem größeren Reben- und Reblausmaterial auf ihre Allgemeingültigkeit im Wechselspiel Rebe — Reblaus geprüft werden, um als gesicherter Befund einige Schlußfolgerungen über die physiologischen Ursachen von Befall und Nichtbefall zu ermöglichen und um gleichzeitig als Ausgangsposition für weitere physiologische Untersuchungen zu dienen.

2. Material und Methode

Die Untersuchungen erstreckten sich über 3 Jahre (1956 bis 1958), und alle Versuche wurden in mehrfacher Wiederholung durchgeführt. Als Untersuchungsmaterial dienten die bekannten BÖRNERschen Reblausrassen (= Fundatrixnachzuchten) 140, 208, 278, 943 (BÖRNER und SCHILDER 1934) und die Rebensorten Mourvèdre × Rup. Ganzin, „C. 1202", W. Burgunder × Rup. du Lot, „Na 59-14", Rip. Millardet × Gamay noir, „Oberlin 595", „Rup. du Lot" und „Rup. Ganzin". *Rupestris*-Sorten oder Sorten mit eingekreuztem *Rupestris*-Erbgut eignen sich auf Grund der Triebspitzenform und der geringen Behaarung der jungen Blättchen (siehe SEELIGER 1933 u. a.) für die Versuchsanstellung besonders gut. Alle Versuche liefen in der Zeit zwischen Anfang Juni bis Mitte September im Gewächshause bei einem Temperaturmittel von 22,8 °C und waren durchschnittlich nach 2 bis 2½ Monaten beendet. Zu jeder Versuchsserie gehörten 25 bis 30 Topfreben, deren Anzucht im Freiland erfolgte und die bei Versuchsbeginn mit einem Jahresaustrieb von 20 bis 25 cm in das Gewächshaus überführt wurden.

Die Versuchsreben wurden zuerst mit einer Reblausrasse infiziert, die Blattgallen zu bilden vermag (Erstbewohner der Galle). Als Infektionsmaterial dienten reblausverseuchte Rebenblätter, die mit Holzstäbchen an den Sproßteilen der Versuchsreben befestigt wurden. Nach vier- bis fünftägiger Infektionsdauer wurden die Topfreben unter einer Glasglocke mit Ventox (Acrylnitril) entseucht, indem das Insektizid in einer Petrischale unter die gleiche Glasglocke gebracht wurde. Der Zeitpunkt zur Abtötung des Insektes wurde so gewählt, daß die an den jungen Blättern induzierten Gallen als deutlich sichtbare Ver-

tiefungen in Erscheinung traten (½ bis 1 mm tiefe Blatteinsenkungen), die abgetötete Laus aber mit einem feinhaarigen Pinsel noch mühelos daraus entfernt werden konnte. Das ist nur dann der Fall, wenn sich die Gallen noch nicht durch Haarausbildung geschlossen haben. Die Entseuchung muß unter Ausschluß direkten Sonnenlichtes erfolgen, da sonst die zur Abtötung des Insektes erforderliche Einwirkungszeit Pflanzenschädigungen hervorruft. Die Entseuchungszeit ist stark temperaturabhängig und beträgt im Durchschnitt 30 Minuten.

Das stark flüchtige Insektizid erlaubt nach zwei- bis dreistündigem „Auslüften" der Versuchsreben eine zweite Infektion in der oben beschriebenen Weise, die aber diesmal mit einer nicht kongenialen Reblausrasse durchgeführt wurde, d. h. mit einer Rasse, deren Einstich in das Normalgewebe der Rebensorte Nekrosen hervorruft (als Normalgewebe bezüglich der Nekrosereaktion als auch bezüglich der Vergallungsreaktion der Reben ist nur undifferenziertes Entwicklungsgewebe zu betrachten). Die Jungläuse versuchen vergeblich die jungen Blätter der unanfälligen Rebensorte zu vergallen und gelangen bei der Suche nach einer geeigneten Futterquelle in die induzierten jungen Gallen (Zweitbewohner der Galle). Die Wiederbesiedlung erfolgt um so besser, je kürzer der Zeitraum zwischen der Abtötung der ersten Rasse und dem erneuten Einstich der folgenden Rasse ist. Es ist deshalb vorteilhaft, bei der zweiten Infektion nur solche reblausverseuchte Rebenblätter anzuheften, deren Gallen mit schlüpfreifen Eiern angefüllt sind. Ferner gelingt die Wiederbesiedlung der jungen Gallen um so besser, je weiter die Gallbildung unter dem Einfluß des Erstbewohners zum Zeitpunkt der Entseuchung schon fortgeschritten war.

Besonders zu beachten ist, daß bei der Entfernung der angehefteten Rebblätter der ersten Infektion an den Versuchsreben keine Eier der cecidogenen Rasse zurückbleiben, denn die ovozide Wirkung von Acrylnitril ist wesentlich geringer als seine insektizide Wirksamkeit. Durch nachträgliches Ausschlüpfen von Jungläusen aus diesen Eiern würde die Versuchsdurchführung gestört.

Bei allen Versuchen wurden nach der Abtötung der erstbewohnenden Reblausrasse einige Reben von der zweiten Infektion ausgeschlossen, um die Wirksamkeit des Insektizides zu kontrollieren.

3. Versuchsergebnisse

Punktnekrose und Beutelgalle sind extreme Reaktionen der Reben bei Reblausbefall (Abb. 1). Beide Reaktionen sind durch gleitende Übergänge verbunden. Bezeichnet man nach Börner und Schilder (1934) die eindeutigste Nekrosereaktion mit „A" und die ungehemmte Gallenentwicklung mit „J", so hat man mit dem fortlaufenden Alphabet von A bis J ein Bonitierungsschema in der Hand, das die Mannigfaltigkeit im Reaktionsgeschehen zu charakterisieren versucht (Tab. 1 und Abb. 2 bis 10). Dieses Bonitierungsschema bezieht sich vor allem auf das endgültige Befallsbild an dem entfalteten, differenzierten Rebblatt. Das

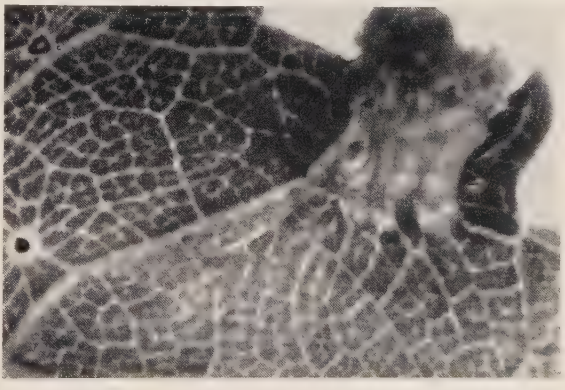

Abb. 1. Vergallungs- und Nekrosereaktion eines Rebenblattes bei Reblauseinstich. Vergr. 5fach

Abb. 2—10. Reaktionstypen bei Blattlausbefall, geordnet nach dem BÖRNER-SCHILDERschen Bonitierungsverfahren

Befallsbild an jüngeren Blättern verändert sich meist noch stark und gibt nur bei den extremen Reaktionstypen Aufschluß über den Resistenzgrad.

Das Hauptaugenmerk der Untersuchungen wurde darauf gerichtet, zu verfolgen, wie sich Reblausrassen, die im Normalgewebe einer Rebensorte extreme oder abgeschwächte Nekrosereaktion auslösen, auf der gleichen Rebensorte in vorgebildeten, jungen Gallen verhalten.

Aus der Vielzahl der durchgeprüften Rebe-Reblaus-Kombinationen sollen nur einige charakteristische Versuche beschrieben werden. Sie zeigen

Tabelle 1

Vereinfachte Darstellung

des Börner-Schilderschen Bonitierungsschemas für Blattreblausbefall

A	Großpunktige, schmalgerandete Nekrose. Der Parasit geht nach vergeblichen Einstichen in das Blattgewebe zugrunde, ohne an den Einstichstellen seßhaft zu werden.	Abb. 2
B	Kleinpunktige, breitgerandete Nekrose. Der Parasit geht nach vergeblichen Einstichen in das Blattgewebe zugrunde, ohne an den Einstichstellen seßhaft zu werden.	Abb. 3
C	Helle Einstichstelle (Fenster) ohne Nekrosepunkt. Der Parasit geht nach vergeblichen Einstichen in das Blattgewebe zugrunde. Er kann jedoch an den Einstichstellen vorübergehend seßhaft werden.	Abb. 4
D	Einstichstelle mit dunklem Nekrosering (hellgerandet). Der Parasit geht nach vergeblichen Einstichen in das Blattgewebe zugrunde. Er kann jedoch an den Einstichstellen vorübergehend seßhaft werden.	Abb. 5
E	„Netzfleck" ohne Haarring (Aderung stark gestört). Der Parasit verweilt mehrere Tage an den Einstichstellen und beeinflußt wesentlich größere Blattbezirke um den Stichkanal. Er kommt verzögert zur Entwicklung (1 bis 2 Häutungen).	Abb. 6
F	Große, dunkle Nekrosen ohne aufgehellten Rand. Die Nekrosereaktion setzt sich erst etwa 5 Tage nach erfolgtem Einstich durch. Der Parasit wird seßhaft und kommt verzögert zur Entwicklung (1 bis 3 Häutungen).	Abb. 7
G	Großer Stichfleck mit dunklem, nekrotischem Adernetz (Aderung stark gestört). Der Parasit wird seßhaft und kommt verzögert zur Entwicklung — aber noch nicht zur Fortpflanzung. Die Einstichstelle wird zur nekrotischen Blattvertiefung (Anfangsstadium der Gallbildung). Die Nekrosereaktion setzt sich erst nach etwa 6 bis 8 Tagen durch.	Abb. 8
H	Gallenandeutende Blattvertiefung mit Haaren. Nekroseerscheinungen treten nicht auf. Der Parasit wird seßhaft und kommt verzögert zur Entwicklung — in Ausnahmefällen auch zur Fortpflanzung.	Abb. 9
j	Kleine Blattgallen. Der Parasit kommt zur mehr oder weniger gehemmten Entwicklung und Fortpflanzung.	Abb. 10
J	Große Blattgallen. Der Parasit kommt zur ungehemmten Entwicklung und Fortpflanzung.	

genügend deutlich das unterschiedliche Reaktionsvermögen von Wirtspflanze und Parasit auf diese „erzwungene" Gemeinschaft. (Tab. 2).

Versuch 1

An normalem Blattgewebe von Oberlin 595 geht die Rasse 208 nach vergeblichen Einstichen bald zugrunde. Sie hinterläßt auf den Blättern Punktnekrosen vom Typ A und B, also extreme Unanfälligkeitsreaktionen.

Gelangen dagegen die Rebläuse dieser Rasse als zweite Infektion in die vorgebildeten Junggallen, die sich an den gleichen jungen, mit Nekrose reagierenden Blätter befinden, so siedeln sie sich darin zahlreich an. Die Rebläuse beginnen mit der Entwicklung, doch erfolgt schon nach 6 bis 7 Tagen eine rapide Abwanderung aus den vorgebildeten Junggallen. Das Gallenwachstum kommt zum Stillstand, der Gallenboden bräunt sich und in der Folgezeit setzt sich die Nekrosereaktion vollständig durch. Die Läuse kümmern, verfärben sich auffallend tiefgelb und 18 Tage nach der Zweitinfektion befinden sich auf den Versuchsreben keine Parasiten mehr. Die Rasse 208 kommt in den vorgebildeten Gallen zwar zur gehemmten Entwicklung, gelangt aber nicht zur Eiablage.

Versuch 2

Beim Einstich der Rasse 140 in normales Blattgewebe von C. 1202 entstehen vorwiegend Punktnekrosen vom Typ A, B wie bei Versuch 1. Die Rebläuse gehen also auch bei dieser Rebe-Reblaus-Kombination nach vergeblichen Saugversuchen zugrunde.

Wurden dagegen bei der gleichen Rebensorte Junggallen vorgebildet, so besiedeln die Rebläuse bereitwillig diese Blattvertiefungen und selbst nach 10 Tagen hat sich die Besiedlungsdichte nicht wesentlich geändert. Der Parasit kommt verzögert zur Häutung und erreicht sogar das Fortpflanzungsstadium. Die Zahl der abgelegten Eier einer Altlaus schwankt zwischen 3 und 14 Stück bei einem Durchschnitt von 5 bis 6 Eiern.

Die Entwicklung der Galle kann von der zweiten Reblausrasse nicht sichtbar gefördert werden, doch bleibt die Verflachung der Reblausgallen aus, wie sie bei völlig von Rebläusen verlassenen Gallen im Verlauf des weiteren Blattwachstums eintritt. Ein schwacher cecidogener Reiz muß demnach schon wirksam sein. Vorzeitige Nekroseerscheinungen, wie sie bei der Kombination Oberlin 595 / Rasse 208 (Versuch 1) beobachtet wurden, treten nicht auf. Die Nekrosereaktion der gegenüber der Reblausrasse 140 nicht kongenialen Rebensorte kommt also nicht mehr zum Durchbruch.

Die aus den Eiern schlüpfenden Jungläuse erzeugen am Normalgewebe der Triebspitzen der Versuchsreben die typische Reaktion der Rasse 140 — Nekrosen vom Befallstyp A, B.

Versuch 3

Die Wechselbeziehungen der Reblausrasse 208 und der Rebensorte C. 1202 lassen einen weiten Spielraum zu. Die Wirtspflanze kann bei Einstich des Insektes in Normalgewebe sowohl mit reiner Nekrose vom Typ A, B oder C, als auch mit abgeschwächter Nekrose vom Typ E, F oder G re-

Tabelle 2

Zusammenstellung der Versuche und Versuchsergebnisse*)

Versuch	Rebensorte	Erstbewohner der Galle (cecidogene Rasse)		Zweitbewohner der Galle		
				Primärreaktion auf der Wirtspflanze (Einstich in Normalgewebe des Rebblattes)		Sekundärreaktion auf der Wirtspflanze (Einstich in das induzierte Gallengewebe)
		Rasse	Infektionsergebnis	Rasse	Infektionsergebnis	Infektionsergebnis
1	Rip. × Gamay Oberl. 595	943	Befallstyp J	208	Befallstyp **A** B	Keine Förderung des Gallwachstums. Nekrosereaktion setzt sich durch. Parasit kommt nicht zur Fortpflanzung.
2	Mourv. × Rup. C. 1202	943	Befallstyp J	140	Befallstyp **A** B	Keine Förderung des Gallwachstums, doch wird Verflachung der Junggalle verhindert. Nekrosereaktion setzt sich nicht durch. Parasit kommt zur Fortpflanzung (durchschnittlich 5 bis 6 Eier je Altlaus).
3	Mourv. × Rup. C. 1202	943	Befallstyp J	208	Befallstyp **A B C E F G**	Schwache Förderung des Gallwachstums. Parasit kommt zur Fortpflanzung (durchschnittlich 18 Eier je Altlaus).
4	W. Burg. × Rup. Na 59-14	208	Befallstyp J	378	Befallstyp **F**	Mittlere Förderung des Gallwachstums. (Gallen wachsen bis zu einer Größe von ~ 2 mm heran.) Parasit kommt zur Fortpflanzung (durchschnittlich 40 Eier je Altlaus).
5	W. Burg. × Rup. Na 59-14	208	Befallstyp J	943	Befallstyp **F**	Förderung des Gallwachstums zur normalen Beutelgalle. Rassenwechsel verursacht keine Wachstumsstockung der Galle. Keine Entwicklungsverzögerung des Parasiten — normale Eiablage.

*) Der fettgedruckte Reaktionstyp überwiegt im Befallsbild.

agieren. Beim Nekrosetyp F oder G werden die Rebläuse an der Einstichstelle seßhaft, kommen verzögert zur zweiten oder gar dritten Häutung, gehen aber schließlich vor der Fortpflanzung zugrunde.

Setzt sich dagegen die Rasse 208 in den vorbereiteten Junggallen fest, so kann der zweite Gallenbewohner das Gallenwachstum auch weiterhin schwach fördern. In einigen Fällen konnte sogar an für die Gallenentwicklung günstigen Stellen des Blattes (Blattrand, Blattbasis — Zonen intensiven Blattwachstums) die Entstehung verkümmerter Beutelgallen verfolgt werden. Diese schwache Förderung des Gallenwachstums ist keine unmittelbare Nachwirkung des cecidogenen Reizes des Erstbewohners der Galle. Es ist bekannt und wird durch Beobachtungen an den Kontrollreben dieser Versuche bestätigt, daß zur Entwicklung einer Galle ein ständig wirkender Reiz notwendig ist. Wird also die Verflachung der vorgebildeten Gallen verhindert und darüber hinaus das Gallenwachstum sogar gefördert, so kann man darin nur eine Wirkung der zweitbewohnenden Reblausrasse erblicken.

Die Rebläuse entwickeln sich in diesen Gallen und erreichen das Fortpflanzungsstadium. Die Zahl der abgelegten Eier schwankt zwischen 5 und 32 Stück, wobei im Durchschnitt von einer Altlaus 18 Eier produziert werden.

Die aus diesen Eiern schlüpfenden Jungläuse reagieren an den in der Zwischenzeit weitergewachsenen Triebspitzen der Versuchsreben nicht nur mit Nekrosen entsprechend der Reaktion der Rasse 208 an normalem Blattgewebe von C. 1202, sondern der überwiegende Teil der Jungläuse induziert Kümmergallen, die als Übergangsstufe vom Befallstyp H zu J aufzufassen sind. Diese Jungläuse gelangen nun auch ohne vorgebildetes Gallparenchym zur Eiablage (durchschnittlich 6 Eier je Reblaus) und die daraus hervorgehenden Läuse sind wiederum zu gleicher Leistung an derselben, inzwischen noch weitergewachsenen Triebspitze befähigt.

Als Ursache für diese Veränderung im Wirt-Parasit-Verhältnis kommt vor allem der wochenlange Gewächshausaufenthalt der Versuchsreben in Frage. Durch die veränderten Umweltbedingungen werden die ohnehin schon stark variablen Wechselbeziehungen zwischen der Reblausrasse 208 und der Rebensorte C. 1202 weiter in Richtung Gallbildung verschoben (im Vergleich zum Befallsbild der im Freiland herangewachsenen Reben bei Versuchsbeginn).

Versuch 4

Die Rasse 378 erzeugt auf den Blättern von Na 59-14 Nekrosen vom Typ F. Die Nekrosereaktion setzt sich erst ungefähr fünf Tage nach erfolgtem Einstich in das Blattgewebe durch. Damit wird den Rebläusen die Nahrungsquelle entzogen und die Parasiten verlassen in der folgenden Zeit die Wirtspflanze.

Ermöglicht man dieser Reblausrasse die Nahrungsaufnahme an Na 59-14 durch vorgebildete, junge Gallen (1/2 bis 1 mm tiefe Blatteinsenkungen), so wachsen die induzierten Gallen überraschenderweise bis zu einer Größe von durchschnittlich 2 mm heran. Mehrmals vermochte der zweite Gallenbewohner das Wachstum sogar so weit zu fördern, daß abgeflachte größere Beutelgallen entstanden.

Bemerkenswert ist jedoch die frühzeitige Bräunung des Gallengewebes. Obwohl die Altläuse die Eiablage noch nicht abgeschlossen haben, treten im Gallparenchym an verschiedenen Stellen nekrotische Bezirke auf. Derartige Erscheinungen sind jedoch auch bei normalen Gallenentwicklungen kongenialer Rebensorten zu beobachten. Es scheint, als ob Rupestrissorten oder Sorten mit eingekreuztem Rupestriserbgut besonders zur Nekrose neigen, während die Blattgallen der Ripariasorten auch nach dem Tode der Altläuse noch längere Zeit lebensfähig bleiben.

Ähnliche Beobachtungen über eine erbliche Neigung zur Nekrosenbildung wurden von Quadt (1953), Golimick (1955, 1959) u. a. (Lit. bei Quadt 1953) beschrieben.

Entsprechend dem stärkeren Gallwachstum ist auch die Entwicklung und Fortpflanzung der Rasse 378 auf der „erzwungenen" Wirtspflanzensorte weniger gehemmt. Von einer Laus werden im Durchschnitt 40 Eier abgelegt. Durch die mehr oder weniger geschlossenen Gallen lassen sich ohne deren Beschädigung keine exakten Eizählungen durchführen. Trotzdem war die Erhöhung der Eizahl im Vergleich zur Eiproduktion der zweiten Gallenbewohner bei den vorher beschriebenen Versuchen genügend deutlich zu beobachten.

Die aus den Eiern schlüpfenden Jungläuse der Rasse 378 erzeugen an dem normalen Blattgewebe der Triebspitze, trotz der eindeutigen Förderung des Gallwachstums durch diese Rasse als Zweitbewohner, wieder Nekrosen. Es tritt der für diese Rebe-Reblaus-Kombination bekannte Nekrosetyp auf (F).

Versuch 5

Die Rasse 943 regt die Rebensorte Na 59-14 bei Primärinfektion zur Bildung großer, tiefbrauner Nekrosen vom Reaktionstyp F an (vgl. Versuch 4).

Ganz anders reagiert dagegen die Rebensorte auf den Befall durch die gleiche Reblausrasse, wenn der Einstich in das in geringer Menge vorgebildete Gallparenchym erfolgt. Die Gallentwicklung schreitet dann unabhängig vom Rassenwechsel ohne sichtbare Stockung bis zur normalen Beutelgalle fort.

Nekrotische Bezirke treten im Gallparenchym nicht auf. Die an der nicht kongenialen Wirtspflanzensorte „erzwungene" Nahrungsaufnahme bleibt auch ohne sichtbaren, nachteiligen Einfluß auf die Rebläuse. Die Entwicklung der umgesetzten Rasse verläuft in der Galle ohne Verzögerung zur eierlegenden Altlaus, deren Eizahlen das normale Ausmaß von Infektionen auf kongenialen Rebensorten erreichen. Damit tritt ein vollständiger Wechsel von Unanfälligkeit (Nekrosereaktion) zur vollen Anfälligkeit mit tiefen Beutelgallen und hohen Eizahlen auf. Ausschlaggebend dafür ist der von einer cecidogenen Rasse gegebene Anstoß zur Gallbildung. Eine 4- bis 5tägige Nahrungsaufnahme der cecidogenen ersten Rasse genügt, um eine mehrwöchige Nachbesiedlung durch eine nicht kongeniale Reblausrasse zu ermöglichen.

Bemerkenswert ist noch, daß die aus den Eiern der zweitbewohnenden Reblausrasse schlüpfenden Jungläuse an den inzwischen weitergewachsenen Triebspitzen der Versuchsreben, entsprechend ihrer genetisch festgelegten Befallsreaktion an normalem Blattgewebe von Na 59-14, Nekrosen erzeugen.

Diese Befunde zeigen, daß durch Variieren der Rebe-Reblaus-Kombinationen für die sekundären Gallenbewohner auf den nicht kongenialen Rebensorten unterschiedliche Ernährungs- und Fortpflanzungsbedingungen geschaffen werden können. Das zwischen Parasit und normalem Wirtsgewebe eingeschobene Gallparenchym kann dabei als Ausgleichsfaktor die mehr oder weniger starke Unverträglichkeit der Reaktionspartner überbrücken. Bei Versuch 1 genügt jedoch selbst diese „Pufferwirkung" nicht, um den Durchbruch der Nekrosereaktion zu verhindern. Entscheidend dafür ist vor allem der Grad der Nekrosereaktion des zweiten Gallenbewohners bei Einstich in normales Blattgewebe der Rebensorte.

Bei Reblausrassen mit extremer Nekrosereaktion (Typ A, B, C, D) als sekundäre Gallenbewohner kommt die Cecidogenese zum Stillstand. Entweder nekrotisiert das vorgebildete Gallengewebe und die Rebläuse gehen ohne Fortpflanzung zugrunde, oder das Parenchym stirbt nicht ab, die Läuse können sich in den Kümmergallen noch mangelhaft ernähren und eine verzögerte Entwicklung mit schwacher Eiablage durchlaufen. Die Verflachung der Gallen wird dann von dem Parasiten verhindert. Neigt dagegen die Befallsreaktion am Normalgewebe zu „mittleren" Nekrosetypen (E, F, G, H), so wird das Wachstum der induzierten Galle vom zweiten Gallenbewohner auch weiterhin mehr oder weniger intensiv gefördert. Der Anstoß zur Gallbildung kann sogar der umgesetzten Rasse genügen, die Galle und damit sich selbst zur vollen Entwicklung zu bringen.

Es treten also von der nekrogenen Wirkung des zweiten Gallenbewohners auf das vorgebildete Gallparenchym, über die Verträglichkeit des zweiten Gallenbewohners mit der nicht kongenialen Rebensorte (ohne eindeutige Förderung des Gallwachstums), bis zum vollwertigen Ersatz der cecidogenen ersten Reblausrasse durch den zweiten Gallenbewohner, gleitende Übergänge auf.

4. Besprechung der Ergebnisse

Die Befunde der vorliegenden Arbeit stimmen im wesentlichen mit der Beobachtung von BÖRNER überein. Bei bestimmten Rebe-Reblaus-Kombinationen kann sich tatsächlich der zweite Gallenbewohner auf nicht kongenialen Rebensorten entwickeln und fortpflanzen. Die Überprüfung eines größeren Materials zeigte jedoch, daß graduelle Unterschiede in der Fortpflanzungsintensität des zweiten Gallenbewohners bestehen und außerdem Kombinationen geschaffen werden können, bei denen die nicht kongenialen Rebensorten trotz des vorgebildeten Gallparenchyms dem zweiten Gallenbewohner keine Fortpflanzungsmöglichkeiten bieten (vgl. Versuch 1).

Bei jeder Rebe-Reblaus-Kombination reagierte der zweite Gallenbewohner in spezifischer Weise, doch besteht offenbar die Möglichkeit, bei veränderter Versuchsmethode die Entwicklungs- und Fortpflanzungsintensität des zweiten Gallenbewohners zu beeinflussen. Bei den eigenen Untersuchungen sticht die zweite Reblausrasse in die geringen Mengen Gallparenchym ein, die infolge einer 4- bis 5tägigen Nahrungsaufnahme der cecidogenen Rasse gebildet wurden. BÖRNER (1949) beobachtete aber Jungläuse einer nicht kon-

genialen Reblausrasse, die in nahezu ausgewachsene Gallen einer anderen Rasse einstechen und dort, ohne einen kontrollierbaren Einfluß auf das Gallwachstum auszuüben, schmarotzen. Durch die wesentlich größeren Mengen Gallparenchym könnten bei den Beobachtungen von Börner noch Reblausrassen zur Fortpflanzung gelangen, die bei unseren Versuchen vor der Eiablage zugrunde gingen. Es ist bekannt, daß Rebläuse ihre volle Größe und Fruchtbarkeit nur dann erreichen, wenn auch das Gallengewebe eine normale Ausbildung erfahren hat. Je mehr Gallparenchym vorhanden ist, desto ungehemmter verläuft die Entwicklung des Schädlings.

Börner (1949) und Wartenberg (1949) haben aus diesen Beobachtungen die Schlußfolgerung gezogen, daß das Gallengewebe die Fähigkeit des unanfälligen Normalgewebes, den Parasiten durch Nekrosereaktion abzuwehren, nicht mehr besitzt. Nach Auslösung des zum Gallwachstum führenden Reizes stumpfen die Zellen in ihrer sonstigen Reaktionsfähigkeit ab. Das Gallgewebe verhält sich dann wie anderweitig differenziertes Blatt- und Wurzelgewebe, das zu keiner Nekrosereaktion mehr fähig ist.

Zweifellos darf aus der bei den eigenen Untersuchungen unverkennbaren „Pufferwirkung" des Gallparenchyms die gleiche Schlußfolgerung gezogen werden. Das vorgebildete Gallparenchym ist aber durch seine „abgestumpfte" Reaktionsfähigkeit nicht nur zur Ernährung einer nicht kongenialen Reblausrasse geeignet, sondern ist gleichzeitig die Voraussetzung zur weiteren Förderung des Gallwachstums durch den Zweitbewohner. Es zeigte sich, daß neben einem Wechsel in der Verwertbarkeit der angebotenen Nahrung vor allem auch ein Wechsel im Gallenbildungsvermögen erfolgt (vgl. Versuch 4 und 5). Das läßt den Schluß zu, daß die Verwertbarkeit der Nahrung und die Auslösung einer Cecidogenese oder Nekrose unmittelbar zusammenhängen.

Börner (1949) schreibt dazu, daß es nahe liegt, die Unterschiede im Befall und Nichtbefall der Arten und Rassen der Reben durch die Reblaus auf Unterschiede in der Struktur und Aufschlußfähigkeit der pflanzlichen Eiweißkörper zurückzuführen.

Prinz (zit. Blagowestschenski 1955) kommt zu der Auffassung, daß die Verwertbarkeit der Nahrung in Verbindung mit einem Resistenzmechanismus der Reben über Befall und Nichtbefall entscheidet. Die Reblaus scheidet demnach ein proteolytisches Enzym ab, das die Eiweiße der Pflanzenzelle in eine physiologisch verwertbare Form überführt. Die erschlossene Nahrungsquelle läßt den Parasiten seßhaft werden und der fortwährende, lang anhaltende Reiz führt zur Gallbildung. Wird dagegen das proteolytische Enzym durch oxydierte phenolische Inhaltsstoffe der Reben (z. B. oxydierte Flavone), die durch Einwirkung eines oxydierenden Enzymsystems (Oxydase bzw. Peroxydase) entstanden sind, inaktiviert, so muß die Reblaus bald verhungern — die Rebe ist nicht anfällig.

Eine gewisse Einschränkung erfährt allerdings diese Ansicht durch Kostik (1954), einen Mitarbeiter von Prinz. Er konnte feststellen, daß die Gewebe von Rebensorten, die alle Bedingungen zur Inaktivierung des proteolytischen Enzyms besitzen, trotzdem von der Reblaus befallen werden.

Die Inaktivierung der Reblausfermente durch phenolische Verbindungen kann deswegen nicht der Hauptgrund der Reblauswiderstandsfähigkeit sein. KOSTIK nimmt an, daß sich der Parasit in beschränktem Umfange auch von den ohnehin im Zellsaft gelöst vorliegenden Nährstoffen ernähren kann.

Nach den Befunden von HOPP (1955) ist die Auslösung einer Cecidogenese oder Nekrose ebenfalls von der Verwertbarkeit der angebotenen Nahrung abhängig. Mit dem Speichel des Parasiten gelangt das proteolytische Enzym in das Pflanzengewebe und entfaltet bei pH 4 seine optimale Wirksamkeit. Werden dadurch physiologisch verwertbare, N-haltige Verbindungen in ausreichender Menge verfügbar, so wird das Tier sessil und gibt weiterhin Speichel ins Zellgewebe ab. Dabei werden dem Gewebe auch derartige Dosen eines Wuchsstoffes (wahrscheinlich β-Indolylessigsäure) zugeführt, daß es unter Berücksichtigung des Konzentrationseffektes dieses Stoffes zur Bildung der bekannten Reblausgalle kommen kann.

Damit wird diese Auffassung der häufig vertretenen Ansicht gerecht, daß im Speichel der Gallinsekten mindestens zwei wirksame Prinzipien vertreten sein müssen — ein proteolytisches Enzym und der eigentliche cecidogene Reizstoff.

Über die Natur dieser cecidogenen Substanz oder Substanzen gehen allerdings die Meinungen auseinander. Während NYSTÉRAKIS (1946), KLOFT (1951 a und b), HOPP (1955) u. a. glauben, β-Indolylessigsäure als wirksamen Wuchsstoff nachgewiesen zu haben, kam ANDERS (1957 a) zu dem Ergebnis, daß β-Indolylessigsäure als Gallenindukter ausscheiden muß. Er lenkt dagegen die Aufmerksamkeit auf die Aminosäuren Glutaminsäure, Histidin und Tryptophan, die in bestimmter Kombination zu besonders intensiver Gallbildung befähigt sein sollen. Es handelt sich dabei um Spaltprodukte der mit der Nahrung aufgenommenen Pflanzenproteine.

In diesem Zusammenhang ist noch die Feststellung von MOEWUS (1948, 1949), TEGETHOFF (1951) u. a. (Literatur bei MOEWUS 1949) wichtig, daß bis zu 95 % der pflanzlichen Wuchsstoffe an pflanzliche Eiweiße gebunden sein können und daß dieser gebundene Wuchsstoff durch proteolytische Enzyme wieder in Freiheit gesetzt werden kann, indem die Eiweiße abgebaut werden. Überträgt man diese Befunde auf das Wechselspiel zwischen Wirt und Parasit (HENKE — mündl. Mitt.), so ist denkbar, daß im Wirkungsbereich des proteolytischen Enzyms der Reblaus die Wuchsstoffe „aktiviert" werden und ihrerseits die Gallbildung auslösen. Voraussetzung ist allerdings, daß tatsächlich die freien Wuchsstoffe die wachstumsaktive Form darstellen. Eine besondere cecidogene Substanz des Parasiten anzunehmen würde damit überflüssig und die Entscheidung über Befall und Nichtbefall bei der Verdaulichkeit der Eiweiße durch das proteolytische Enzym oder bei einem Inaktivierungsmechanismus des Enzyms im Sinne von PRINZ liegen.

Nach diesen Auffassungen wäre die Wirkung des vorgebildeten Gallparenchyms (s. eigene Untersuchungen) dann so zu verstehen, daß die geringen Mengen Gallparenchyms einen Wechsel in der Verwertbarkeit der pflanzlichen Eiweiße für den Parasiten herbeiführen, oder daß der Inaktivierungsmechanismus der Wirtspflanzen mehr oder weniger unwirksam wird. Wie dieser

tiefgreifende Wechsel durch das Gallparenchym hervorgerufen wird, ist dabei noch vollständig ungeklärt.

Bei dieser Deutung der Befunde ergibt sich aus dem Reblausrassenproblem folgende Schwierigkeit: Berücksichtigt man, daß auf der gleichen Rebe — also bei vollständig gleichem Nahrungsangebot und gleichem physiologischen Zustand des Wirtes, also auch gleichem Inaktivierungsmechanismus gegenüber dem proteolytischen Enzym — der Einstich der Reblausrassen zur Gallbildung und Nekrosereaktion führen kann, so muß man für die sich zweifellos sehr nahestehenden Rassen (= Fundatrixnachzuchten!) des Insektes qualitativ unterschiedliche proteolytische Enzyme oder zumindest quantitative Unterschiede in der Enzymaktivität annehmen. Qualitative Unterschiede haben dabei die geringste Wahrscheinlichkeit und quantitative Unterschiede in der Enzymaktivität sind noch nicht bewiesen.

Aus diesen Gründen gewinnt die Vorstellung an Bedeutung, daß nicht die Verwertbarkeit der angebotenen Nahrung, oder ein spezifischer Inaktivierungsmechanismus des proteolytischen Enzyms, sondern das Vermögen des Parasiten, Gallbildung auszulösen, als primäre Reaktion über Befall und Nichtbefall entscheidet. Die Möglichkeit, die Nährstoffe der Wirtspflanze aufzuschließen und aufzunehmen, wäre demnach lediglich die Folge der Gallbildung.

Von diesem Standpunkt aus wird die Wirkung des vorgebildeten Gallparenchyms auf das Wechselspiel zwischen Rebensorten und Reblausrassen besser verständlich, womit jedoch nicht gesagt werden soll, daß diese Deutung der Befunde den tatsächlichen Gegebenheiten unbedingt näher kommt.

Das differenzierte, „abgestumpfte" Gallengewebe könnte dabei als Verdünnungsfaktor für den cecidogenen Reizstoff des Insektes wirken, und das Umschlagen von Nekrosereaktion zur Gallbildung wäre dann lediglich ein Konzentrationseffekt. Es ist bekannt, daß Substanzen mit Wuchsstoffcharakter (wie z. B. β-Indolylessigsäure, bestimmte Aminosäuren u. a.) in ihrer Wirkung auf pflanzliche Gewebe stark konzentrationsabhängig sind. In unmittelbarer Einstichnähe der Reblaus, also bei hoher Konzentration, erfolgt eine Wachstumshemmung, während mit zunehmender Entfernung vom Stichkanal schließlich eine Verdünnungsstufe des Cecidogens mit optimaler Wachstumsförderung erreicht wird (Kloft 1951 a und b, Hopp 1955). Die Nekrosereaktion des Normalgewebes müßte dann folgerichtig als das Ergebnis einer für die Pflanzenzelle letal hohen Konzentration des cecidogenen Reizstoffes aufgefaßt werden — eine Schlußfolgerung, gegen die besonders die Befunde von Prinz (zit. Blagowestschenski 1955) und Hopp (1955) sprechen. Voraussetzung dazu ist natürlich, daß die Zellen der Wirtspflanze unter dem Einfluß eines sortenspezifischen, regen Hormonstoffwechsels stehen und ihre volle Reaktionsfähigkeit besitzen (Wartenberg 1953, 1954, Niklowitz 1955, Gollmick 1958). Erfolgt der Einstich einer nekroseerzeugenden Rasse in das Parenchym der vorgebildeten Galle, so kann sich die letale Konzentration, bevor sie auf reaktionsbereites Normalgewebe trifft, bis zur Verträglichkeit oder gar cecidogenen Wirkung verdünnen. Es kommt dann nicht zur Nekrose, sondern zur weiteren Förderung des Gallwachstums, wie es bei unseren Versuchen zu beobachten war.

Daraus ergibt sich, daß das proteolytische Enzym mit Hilfe des vorgebildeten Gallparenchyms auch zum Abbau der Eiweiße ursprünglich unanfälliger Rebensorten befähigt ist. Die zum Teil intensive Fortpflanzungstätigkeit des zweiten Gallenbewohners ist ein Beweis dafür. Damit dürften die zur Ernährung des Insektes notwendigen Verbindungen auch in unanfälligen Rebensorten vorhanden sein. Sie müssen außerdem in ausreichender Konzentration vorliegen und nach Ausbildung geringer Mengen Gallparenchym von den Rebläusen unmittelbar verwertet oder in eine verwertbare Form überführt werden können. Bei Nekrosereaktion sind die gleichen Nährstoffe, die bei anfälligen Reben die Entwicklung des Parasiten ermöglichen, für das Insekt bedeutungslos. Das Vermögen, Gallbildung auszulösen, ist gewissermaßen als Schlüssel zur Verwertbarkeit der vorliegenden Nahrungsstoffe zu betrachten. Dabei reagiert das Schlüssel-Schloß-Prinzip ganz spezifisch, während das dahinter liegende weite Feld der Nährstoffe für Befall und Nichtbefall von sekundärer Bedeutung sein müßte. Das Unvermögen der Gallbildung würde damit den Wirtspflanzenkreis der Reblaus einengen — nicht die in den Rebensorten vorliegenden Nährstoffe. Für diese Auffassung spricht, daß Gallinsekten überwiegend monophag sind, während andere Pflanzensäftesauger der Insekten, denen der Zugang zu den Nährstoffen ohne Gallparenchym möglich ist, häufiger polyphag sind.

Die Verwertbarkeit der Nahrung und die Auslösung einer Cecidogenese oder Nekrose sind zweifellos ursächlich verbunden, doch möglicherweise derart, daß erst durch das Gallenbildungsvermögen die vorhandenen Nährstoffe zugänglich werden.

Diese Auffassung über die physiologischen Ursachen vom Befall und Nichtbefall schließt jedoch nicht aus, daß die an Eiweiße gebundenen pflanzlichen Wuchsstoffe bei der Gallbildung beteiligt sind. Ist der Anstoß zur Gallbildung von dem cecidogenen Reizstoff des Parasiten gegeben, so können die durch das proteolytische Enzym sekundär freigesetzten Wuchsstoffe durchaus den Effekt verstärken oder abschwächen.

Der Konzentration des cecidogenen Reizstoffes der Reblausrassen käme nach dieser Auffassung besondere Bedeutung zu. Seine Wirksamkeit ist aber nur im Zusammenhang mit einer unterschiedlichen Sensibilität der Rebensorten zu verstehen. Diese unterschiedliche Sensibilität beruht möglicherweise auf einem sortenspezifischen Hormonstoffwechsel der meristematischen Pflanzengewebe (bei nahe verwandten Rebensorten genügen quantitative Unterschiede). Aus dem Zusammenwirken beider Faktoren könnte dann das differenzierte Wechselspiel zwischen Rebensorten und Reblausrassen resultieren.

Diese Deutung der Befunde steht im Einklang zu Beobachtungen beim Kartoffelnematoden (MILDENBERGER und WARTENBERG 1958 und KÜHN 1958). Dieses Wirt-Parasit-Verhältnis führt ebenfalls zur Gallbildung oder Nekrosereaktion, wenn der Reizstoff des Parasiten auf meristematisches Gewebe (= Normalgewebe) trifft, wobei er durch mehrere parenchymatische Zellagen hindurch diffundieren kann, ohne Wirkung zu entfalten.

Kühn (1958) schreibt dazu: „Es ist anzunehmen, daß nur eine verhältnismäßig kleine Konzentrationsdifferenz des Reizstoffes oder ein geringfügiger Unterschied in der Sensibilität der Zellen darüber entscheidet, ob die Wurzel vergallt oder partiell nekrotisch reagiert. Die Tatsache, daß man zwischen den nekrotischen im Zentralzylinder auch hypertrophierte Zellen findet, deutet darauf hin." Er konnte außerdem nachweisen, daß in Abhängigkeit von der Temperatur *H. rostochiensis* in den Kartoffelwurzeln Vergallung oder Nekrose auslöst. Auch diese Feststellung spricht für die Identität von cecidogenem und nekrogenem Reizstoff des Nematoden.

Die Bedeutung des Gallparenchyms für den Nematoden führen die Autoren darauf zurück, daß die Nahrung dem Parasiten unter Druck einverleibt werden muß. Dieser Druck ist vor allem in hoch turgeszenten Zellen von Gallen gewährleistet. Normale Parenchyme oder Meristeme sind kein optimales Nährsubstrat für den Parasiten. Er kann sich einige Zeit darin halten, doch gelangt er nicht zur Geschlechtsreife (s. Befunde bei der Reblaus). Die Möglichkeit der Gallbildung würde damit auch bei *H. rostochiensis* über Befall oder Nichtbefall der Wirtspflanzensorten entscheiden, während die Verwertbarkeit der Nahrung von sekundärer Bedeutung ist.

Die Ergebnisse der Untersuchungen am Kartoffelnematoden und den Reblausrassen zeigen außerdem, daß die Annahme einzelner präformierter, präinfektioneller Inhaltsstoffe der Wirtspflanze als Ursache für die Anfälligkeit bzw. Nichtanfälligkeit dem hochspezifischen Wechselspiel zwischen Wirt und Parasit nicht gerecht wird. Derartig „grobe" Resistenzmechanismen können nicht die Variationen von Befall und Nichtbefall bedingen, wie sie durch die Rassen des Parasiten und Sorten der Wirtspflanze erzeugt werden. Das geht auch aus den Untersuchungen von Henke (1958) hervor und entspricht außerdem den Vorstellungen, zu denen die Untersuchungen über die physiologische Resistenz der Wirtspflanzen gegenüber pilzlichen Parasiten geführt haben (Fuchs 1956, Christiansen-Weniger 1955 u. a.).

Man sucht weniger nach einzelnen chemischen Verbindungen als resistenzbedingende Faktoren, sondern überprüft den Stoffwechsel der befallenen Pflanzen, um daraus Hinweise auf die Ursachen von Befall und Nichtbefall zu erhalten.

Zusammenfassung

1. Die Versuche zum Verhalten nekrogener Reblausrassen in jungen, vorgebildeten Gallen cecidogener Rassen ergaben, daß die zweiten Gallenbewohner auf den nicht kongenialen Rebensorten unterschiedlich zur Entwicklung und Fortpflanzung gelangen.

2. Entscheidend dafür ist vor allem der Nekrosetyp, der bei Einstich des zweiten Gallenbewohners in normales Blattgewebe der nicht kongenialen Rebensorte erzeugt wird.

3. Es tritt ein Wechsel in der Verwertbarkeit der Nahrung der besogenen Rebensorte auf, der zu einem vollständigen Befallswechsel bei der Wirtspflanze führen kann.

4. Dieser Befallswechsel ist mit einem Wechsel im Gallenbildungsvermögen verbunden. Die nekrogene zweite Reblausrasse kann, nachdem von der cecidogenen ersten Rasse der Anstoß zur Gallbildung gegeben wurde, die induzierte Junggalle zur vollen Entwicklung bringen.

5. Die Deutung dieser Befunde ist noch problematisch. Möglicherweise entscheidet nicht die Verwertbarkeit der Nahrung, sondern das Vermögen des Parasiten, Gallbildung auszulösen, über Befall und Nichtbefall der Wirtspflanze.

Summary

1. Experiments on the behaviour of necrogenous phylloxera races in young, previously formed galls of cecidogenous races showed that the second gall insect differed in respect of development and reproduction on non-congenial vine varieties.

2. The principal decisive factor is the type of necrosis that is produced when the second gall race is inoculated into normal leaf tissue of the non-congenial vine variety.

3. A change occurs in the capacity for utilization of the nutritive elements of the infected vine variety which can lead to a complete alteration of the reaction type of the host plant.

4. This change in reaction type is associated with a change in the capacity for gall formation. The second, necrogenous phylloxera race can bring the young induced gall to full development after the first, cecidogenous race has provided the stimulus to gall formation.

5. The interpretation of these findings is still problematical. It is possible that the deciding factor as to whether the host plant is or is not attacked may be not so much the capacity for utilization of the nutrients as the capacity of the parasite to induce gall formation.

Literaturverzeichnis

ANDERS, F., 1957 a: Über die gallenerregenden Agenzien der Reblaus (*Viteus [Phylloxera] vitifolii* Shimer). Vitis **1**, 121—124.

— —, 1957 b: Neuere Auffassungen über die Reblaus-Resistenz. Vitis **1**, 142—152.

BLAGOWESTSCHENSKI, A. W., 1955: Die biochemischen Grundlagen des Evolutionsprozesses der Pflanzen. Berlin.

BÖRNER, C., 1910: Die deutsche Reblaus, eine durch Anpassung an die Europäerrebe entstandene Varietät. K. Biol. Anst. Metz Verl. Meistertzheim.

— —, 1923: Das Problem der Reblausrassen. Rep. Int. Conf. Phytopath. Holland, 69—72.

— —, 1924: Neue Untersuchungen zur Reblausrassenfrage. Angew. Bot. **6**, 160—168.

— —, 1949: Die erblichen Grundlagen von Befall und Nichtbefall der Pflanzen durch tierische Parasiten. Nachr.-Bl. Dt. Pfl.-schutzd. n. F. **3**, 121—130.

— —, und F. A. SCHILDER, 1934: Beiträge zur Züchtung reblaus- und mehltaufester Reben. Mitt. Biol. Reichsanst. Heft 49.

Christiansen-Weniger, E., 1955: Versuche zur stoffwechselphysiologischen Beeinflussung der Reaktion der Kartoffelknolle auf *Phytophthora infestans* de By. Phytopath. Z. **25**, 153—180.

Fuchs, W. H., 1956: Ein Beitrag zur pathologischen Physiologie. Angew. Bot. **30**, 141—146.

Gollmick, F., 1955: Untersuchungen über die Blattbräune (Melanose) der Reben. Phytopath. Z. **23**, 249—322.

— —, 1958: Die Aufgaben der Grundlagenforschung bei der Züchtung krankheitsresistenter Obstsorten. Wiss.-Z. Univ. Halle, math.-naturwiss. Reihe **8**, 51—52.

— —, 1959: Über einen Fall von Blattfleckennekrose bei einem *Malus toringo*-Bastard. Arch. Gartenbau **7**, 3—28.

Henke, O., 1958: Untersuchungen über die biochemischen Grundlagen der Reblausresistenz der Reben. Phytopath. Z. **32**, 149—166.

Hopp, H. H., 1955: Wirkung von Blattreblausspeichel auf Pflanzengewebe. Wein-Wiss. **9**, 9—22.

Kloft, W., 1951 a: Vergleichende Untersuchungen an einigen Cocciden und Aphiden. Verh. Dt. Zool. Marburg 1950, 290—296.

— —, 1951 b: Insekten steuern das Wachsen von Pflanzen. Umschau **51**, 40—42.

Kostik, F. D., 1954: Zur Frage der Erforschung biochemischer Merkmale reblauswiderstandsfähiger Reben. Sbornik trudow Moldawskoj stanzii Wsesojusnogo Instituta saschtschity rastenij, Kischinew, 171—178 (russ.).

Kühn, H., 1958: Über die Abwehrnekrose eines Kartoffelbastards gegen den Kartoffelnematoden (*Heterodera rostochiensis* Wr. in *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* [Juz. et Buk.] HwK. × *Solanum tuberosum* L.). Z. Pflanzenkrankh. **65**, 465—472.

Mildenberger, G., und H. Wartenberg, 1958: Histologische Untersuchungen der Nematodengallen in den Wurzeln der Kartoffelpflanze (*Heterodera rostochiensis* Woll. und *Meloidogyne* spec. in *Solanum tuberosum* L.). Z. Pflanzenkrankh. **65**, 449—464.

Moewus, F., 1948: Gebundener und freier Wuchsstoff in der Kartoffelknolle. Z. Naturforsch. **3 b**, 135.

— —, 1949: Gebundener und freier Wuchsstoff in fleischigen Früchten. Planta **37**, 413—430.

Niklowitz, W., 1955: Histologische Studien an Reblausgallen und Reblausabwehrnekrosen. Phytopath. Z. **24**, 299—340.

Nystérakis, M. F., 1946: Résistance de vignes américaines au *Phylloxera* et sensibilité de leur cellules aux phytohormones. C. R. Acad. Agr. **32**, 444—446.

Quadt, F., 1953: Untersuchungen über erbliche Nekrosen und ihre Beziehungen zur Resistenz. Züchter **23**, 223—243.

Seeliger, R., 1933: Der neue Weinbau. Berlin.

Tegethoff, B., 1951: Zur Frage der Wuchsstoffinaktivierung im Maisscutellum. Planta **38**, 648—682.

Wartenberg, H., 1949: Das Reblausproblem. Festschr. fünfzigj. Best. BZA Berlin-Dahlem, 173—176.

— —, 1953: Über pflanzenphysiologische Ursachen des Massenwechsels der Apfelblutlaus (*Eriosoma lanigerum* auf *Malus pumila*). Mitt. BZA, Heft 75.

— —, 1954: Histologische Studien über Blutlausgallen, Blutlausabwehrnekrosen, Parenchymholzbinden und Markflecke bei *Malus*-Sorten. Wiss. Z. Univ. Jena, math.-naturwiss. Reihe **3**, 409—430.

Aus dem Institut für Phytopathologie
der Landwirtschaftlichen Fakultät der Universität Belgrad
Direktor: Prof. Dr. M. Josifović

Die Rolle des Paprikasamens bei der Virusübertragung[1])

Von
D. Šutić

Mit 5 Abbildungen

Inhalt: I. Einleitung. — II. Experimentelle Untersuchung der Virusübertragung durch Paprikasamen. 1. Material und Methodik; 2. Ergebnisse. — III. Bestimmung der Virusart. 1. Verimpfung des Virus auf verschiedene Differentialwirte; 2. Wirtspflanzen; 3. Antigene Eigenschaften des Virus. — IV. Diskussion. — Zusammenfassung. — Summary. — Literaturverzeichnis.

I. Einleitung

Die Virosen werden immer mehr zum Problem für den sicheren Anbau der Paprikapflanze in Jugoslawien. Sie sind besonders in einigen Gebieten verbreitet, wo Gewürzpaprika für die industrielle Verarbeitung auf großen Flächen angebaut wird. Im Jahre 1956 haben wir in einem Gebiet in der Nähe von Horgosch die Untersuchung einer Paprikavirose aufgenommen. Wir stießen dabei nicht selten auf Parzellen mit einer großen Anzahl infizierter Pflanzen. Auf einer Fläche wurden beispielsweise 814 kranke, unter 2263 untersuchten Pflanzen gefunden, das sind 36 %.

Auf Grund der Diagnose nach Beschreibungen der Paprikavirosen von Kovachevskv (1940, 1942, 1954), Szirmai (1937/40, 1948) und Simons

[1]) Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit ist in der Station Centrale de Pathologie Végétale (I. N. R. A.), Versailles, durchgeführt worden. Ich möchte nicht versäumen, an dieser Stelle den Virologen dieses wissenschaftlichen Instituts meinen besten Dank für ihre bereitwillige Hilfe zu sagen.

Abb. 1. „Reisigkrankheit" des Paprikas. Starke Wipfelverzweigung der Pflanzen

Abb. 2. Nekrosen an der Blattbasis der „reisigkranken" Paprikapflanze

(1957 a und b), wie auch an Hand der Arbeiten anderer Autoren (ANDERSON und CORBETT 1957, GUALACCINI 1956) konnten wir feststellen, daß im Gebiet von Horgosch zwei Virosen vorkommen. Eine von ihnen ist die „Reisigkrankheit" der Paprikapflanze, die durch das Gurkenmosaikvirus hervorgerufen wird (Abb. 1 bis 3), die zweite ist „die Buntblättrigkeit", deren Erreger das Luzernemosaikvirus ist (Abb. 4 u. 5). Die Reisigkrankheit der Paprikapflanze, die am weitesten verbreitet und am häufigsten war, erwies sich als die wirtschaftlich bedeutend schädlichere Virose. Sie hemmte den Fruchtansatz und verminderte beträchtlich auch die Zahl der Früchte befal-

Abb. 3. Früchte „reisigkranker" Paprikapflanzen. Links: gesunde Frucht, rechts: verkümmerte und deformierte Früchte

Abb. 4. „Buntblättrigkeit" der Paprikapflanze

lener Pflanzen. Die gebildeten Früchte blieben meistens klein und verkümmert (Abb. 3). Die Ertragsminderung war besonders auffallend, wenn Mischinfektionen vorlagen, d. h. wenn beide Viren die Pflanzen gemeinsam befielen.

Eine der wichtigsten Fragen für den Anbau ist, ob die den Paprika befallenden Viren durch dessen Samen übertragen werden. Mit der Prüfung der Bedeutung des Paprikasamens bei der Virusübertragung haben sich besonders KOVACHEVSKY (1940) und SZIRMAI (1937/40, 1949) befaßt. Die Ergebnisse, zu denen diese Autoren gekommen sind, sind unterschiedlich und widersprechen einander. Diese ungeklärte Frage hat uns veranlaßt, die Rolle des Paprikasamens bei der Virusübertragung zu untersuchen.

II. Experimentelle Untersuchung der Virusübertragung durch Paprikasamen

1. Material und Methodik

Zur Durchführung der Versuche diente Saatgut der Ernte 1957, das uns vom Laboratorium für die Untersuchungen der Paprikapflanze in Horgosch zur Verfügung gestellt wurde. Untersucht wurden Saatgutproben, die beim normalen Paprikaanbau und auf Anbauflächen gewonnen wurden, an denen die Virosen regelmäßig mehr oder minder stark, in Abhängigkeit von den Witterungsverhältnissen, in Erscheinung treten. Die Virusübertragung mit dem Saatgut verschiedener Proben wurde in drei Versuchen geprüft:

Versuch I: Dieser Versuch wurde als Orientierungsversuch angestellt, um Anhaltspunkte über die Möglichkeit der Virusübertragung durch den Samen zu erhalten. Zu diesem Zwecke wurden einige hundert Samen sehr dicht in flache Tongefäße gesät. Die Aussaat fand am 4. Oktober 1957 statt.

Versuch II: Neben der Feststellung der Virusüber-

Abb. 5. Symptome der „Buntblättrigkeit" an den Paprikafrüchten: weißliche schmale Streifen, die von der Basis bis zur Fruchtspitze verlaufen

tragbarkeit durch das Saatgut sollte eingehend geprüft werden, in welchem Ausmaß diese Übertragungen stattfinden. Zu diesem Zweck wurden je 100 Samen im Abstand von 3 bis 4 cm in flache Tonschalen ausgesät. Die Aussaat erfolgte am 30. November 1957.

Versuch III: In diesem Versuche, der zum gleichen Zweck wie der vorerwähnte angestellt wurde, wurden die Samen einzeln in Tontöpfe ausgesät. Insgesamt wurden hierbei 200 Samen in räumlicher Isolierung gehalten. Die Versuchsanlage erfolgte am 23. Dezember 1957.

Alle Versuche wurden im Gewächshause durchgeführt. Die Töpfe und Schalen wurden in Isolierkammern aufgestellt. Um ihr Wachstum zu fördern, wurden die Pflanzen zum Teil unter künstlicher Beleuchtung gezogen. Die Auszählung der vom Saatgut her infizierten Jungpflanzen wurde in zwei Entwicklungsphasen durchgeführt: Im Kotyledonenstadium und nach der Ausbildung des ersten Blattpaares. Sobald die Pflänzchen so weit entwickelt waren, daß sie einander berühren konnten, stellten wir die Auszählung ein.

2. Ergebnisse

In allen drei Versuchen wurden im Kotyledonenstadium einige erkrankte Pflanzen beobachtet, die ihrem Aussehen nach sich deutlich von den anderen unterschieden. Ihr Wachstum war derart verzögert, daß sie den gesunden Pflanzen gegenüber verzwergt waren. Die Kotyledonen dieser Pflanzen waren von einer großen Zahl weißlicher, punktähnlicher Flecke bedeckt, die ziemlich regelmäßig über die Kotyledonenfläche verteilt waren. Bei einigen Pflanzen zeigten sich auch am ersten Blattpaare Veränderungen. Diese wiesen leuchtend weiße oder gelbliche Flecke von unregelmäßiger Form auf. Infolge dieser Verfärbung, die von der normalen grünen Blattfarbe stark abwich, erschienen die Blätter bunt. Die Zahl derart erkrankter Pflanzen ist in Tabelle 1 darstellt, aus der ersichtlich ist, daß in allen Versuchen aus einigen Samen kranke Pflanzen gewachsen sind.

Tabelle 1

Versuch	Zahl der ausgesäten Samen	Zahl der aufgelaufenen Pflanzen	Zahl der Pflanzen mit sichtbaren Symptomen		Gesamtzahl der infizierten Pflanzen
			an den Kotyledonen	am ersten Blattpaar	
I	Einige Hundert Samen in dichter unregelmäßiger Saat		3	2	5
II	100	96	2	—	2
	100	93	1	1	2
	100	90	—	2	2
	100	93	1	4	5
III	200	193	2	—	2

Die Krankheitssymptome erschienen zunächst nur an den Keimblättern an insgesamt 9 Pflanzen. Bei 9 weiteren Pflanzen zeigten sich auch am ersten Blattpaare Krankheitserscheinungen, während die Keimblätter symptomfrei geblieben waren.

Die an den jungen kranken Pflanzen auftretenden Symptome wiesen auf eine viröse Natur der Erkrankung hin. Um diese Vermutung zu bestätigen, haben wir eine Reihe Beimpfungen junger Paprikapflanzen mit dem aus kranken Pflanzen gewonnenen Preßsaft durchgeführt. Da diese Impfungen positiv verliefen, ist somit nachgewiesen, daß der Erreger dieser Krankheit ein Virus ist, dessen Eigenschaften zum Zwecke seiner näheren Bestimmung untersucht werden sollten.

III. Bestimmung der Virusart

Die Paprikapflanze ist für einige Viren sehr anfällig, nämlich gegenüber den Kartoffelviren X und Y, sowie gegenüber dem Tabak-, Gurken- und Luzernemosaikvirus (Köhler und Klinkowski 1954, Kovachevsky 1940, 1942, 1954, Smith 1957, Szirmai 1937/40). Da es möglich war, daß die Pflanzen von allen genannten Viren befallen waren, sollte festgestellt werden, welches Virus die Erkrankung der Pflanzen in unseren Versuchen hervorgerufen hat oder ob diese Krankheit komplexer Natur ist. Um diese Fragen zu klären, isolierten wir die Viren und untersuchten ihre Wirtspflanzen und ihre antigenen Eigenschaften.

1. Verimpfung des Virus auf verschiedene Differentialwirte

Als Differentialwirte wurden *Lycopersicum esculentum, Nicotiana glutinosa* und *Phaseolus vulgaris* var. „Idaho Refugee" verwendet, die wir mit dem Saft erkrankter Pflanzen mechanisch beimpften.

Die Ergebnisse sind folgende: *L. esculentum* blieb frei von Infektionen, *N. glutinosa* ohne Bildung lokaler Nekrosen, und an der genannten Varietät von *Phaseolus vulgaris* zeigte sich systemisches Mosaik an den Blättern, an denen jedoch lokale Nekrosen nicht in Erscheinung traten. Vergleichende Impfungen an jungen Paprikapflanzen erwiesen sich als positiv.

Aus diesen Ergebnissen ist es klar ersichtlich, daß der aus erkrankten Pflanzen extrahierte Preßsaft weder die Kartoffelviren X und Y noch Gurken- und Tabakmosaikvirus enthielt. Die positive Infektion auf Bohnen wies darauf hin, daß unter allen genannten Viren nur das Luzernemosaikvirus anwesend sein konnte.

2. Wirtspflanzen

Die Untersuchungen der Wirtspflanzen dieses Virus haben wir im Gewächshaus im Dezember 1957 und Januar 1958 durchgeführt. Die als Wirte zu prüfenden Pflanzen wurden mit dem Preßsaft erkrankter Pflanzen aus unseren Versuchen geimpft. Der Preßsaft wurde in einer 0,5 %igen wässerigen Natriumsulfit-Lösung extrahiert, um Oxydationen vorzubeugen. Die Resultate der Impfungen einzelner Pflanzenarten sind aus der Tabelle 2 ersichtlich. Die Ergebnisse zeigen, bei allerdings relativ kleiner Pflanzenzahl, daß Mischinfektionen bekannter Paprikaviren nicht festgestellt wurden. Das be-

stätigen auch wiederholte erfolglose Impfungen von *N. glutinosa* und *L. esculentum*, die wir bereits erwähnten, wie auch die negativen Inokulationen von *Solanum tuberosum* Sorte „Bintje".

Nach den Symptomen der verschiedenen Arten der Leguminosen können wir annehmen, daß im extrahierten Saft nur das Luzernemosaikvirus anwesend war. Dies bestätigen auch die typischen Symptome der „Buntblättrigkeit", die sich später an den erwachsenen Paprikapflanzen gezeigt haben. Für das Vorliegen des Luzernemosaikvirus sprechen auch gelungene Infektionen von *N. tabacum* und *Petunia* sp., die als Wirtspflanzen für dieses Virus bekannt sind.

Tabelle 2

Untersuchungen zum Wirtspflanzenkreis

Pflanzenart	Zahl der geimpften Pflanzen	Zahl der infizierten Pflanzen	Hauptsymptome an den Blättern
Phaseolus vulgaris var. „Idaho Refugee"	2	2	Ältere Blätter: Mosaik, junge Spitzenblätter, schmale längliche Zonen unregelmäßiger Form, anfangs gelblich, später rötlichbraun und nekrotisch
var. „Cotender"	2	2	Schwaches Mosaik und Aufhellung der Nerven
var. „Red Valentine"	1	1	
Nicotiana tabacum	4	4	Leichte Mosaikbildung
Nicotiana glutinosa	2	—	
Pisum sativum	1	1	
Medicago sativa	4	2	Leichtes Mosaik mit Ringflecken
Vicia faba	1	1	Schwaches Mosaik
Petunia sp.	1	1	Unregelmäßige Mosaikflecke
Capsicum annuum	4	3	Mosaik. Gelbe und weißliche unregelmäßige Zonen. Buntblättrigkeit
Lycopersicum esculentum	2	—	
Solanum tuberosum var. „Bintje"	2	—	
Apium graveolens	2	—	

3. Antigene Eigenschaften des Virus

Wir haben mit dem aus erkrankten Pflanzen extrahierten Saft eine Reihe serologischer Analysen mit den Antiseren der Kartoffelviren X und Y, Tabakmosaik- und Gurkenmosaikvirus durchgeführt. In allen Analysen zeigten sich keine spezifischen Reaktionen der Präzipitation.

Zwecks Überprüfung der antigenen Eigenschaften des „Paprikavirus" in unseren Versuchen haben wir Antiseren hergestellt, und zwar aus Paprika, Tabak und Bohnen, die künstlich infiziert worden waren. Der aus Paprika und Tabak extrahierte Saft wurde teilweise gereinigt und war bei Paprika nach Behandlung mit Ammoniumsulfat noch reicher an Viruspartikeln. Durch intramuskuläre Injektion dieses Saftes bei Meerschweinchen bekamen wir Antiseren, die mit Saft der genannten verseuchten Pflanzen positiv reagierten.

Bei den serologischen Reaktionen wandten wir dieselbe Technik an, die in Frankreich LIMASSET mit seinen Mitarbeitern anwendet, und in der ČSR JERMOLJEV empfohlen hat (LIMASSET 1955, LIMASSET und AUGIER DE MONTGREMIER 1948). Die im Laufe der Untersuchungen erzielten Resultate sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3

Saft erkrankter Pflanzen	Antiserum, hergestellt aus dem Saft erkrankter Pflanzen von			Kontrolle	
	C. annuum	*N. tabacum*	*Ph. vulgaris*	Saft mit physiologischer Lösung	Saft mit Normalserum
Capsicum annuum	+	+		—	—
Nicotiana tabacum	+	+		—	—
Phaseolus vulgaris	+	+		—	—

+ = spezifische Präzipitate; leeres Feld = spezifische Präzipitate in Spuren;
— = keine spezifischen Präzipitate.

Aus den in Tabelle 3 dargestellten Ergebnissen ist ersichtlich, daß das untersuchte Virus antigene Eigenschaften aufgewiesen hat. Dies bestätigen besonders die wechselseitigen Reaktionen der Seren mit dem Saft kranker Pflanzen, von denen das Serum nicht stammt, weil hier die Präzipitationen normaler pflanzlicher Proteine und ihrer Antikörper vermieden sind.

Die schwächsten Reaktionen, wo sich Präpitationen nur in Spuren zeigten, wies das Serum von kranken Bohnenpflanzen auf.

Die in Tabelle 3 dargelegten Resultate der Präzipitation, die wir erhielten, haben wir auch durch Prüfungen nach der Methode serologischer Reaktionen in Reagenzgläsern, die anfangs die einzig angewandte Methode war, beweisen können.

IV. Diskussion

Die Virusübertragung durch Paprikasamen ist für den Anbau dieser Pflanze eine sehr wichtige Frage und war deshalb Forschungs- und Diskussionsgegenstand mancher Autoren in den Ländern, in denen der Paprikaanbau ein wichtiges Wirtschaftsproblem darstellt.

In Ungarn befaßte sich mit dieser Frage SZIRMAI (1937/40, 1948), der eine sehr gefährliche Paprikavirose, genannt „Ujhitüseg", untersucht hat. Aus den Ergebnissen seiner ersten Arbeit geht hervor, daß diese Virose durch einen dem Gurkenmosaikvirus verwandten Virusstamm hervorgerufen und etwa zu 30 bis 40 % durch den Samen übertragen wird. Den hohen Prozentsatz der Übertragung des Virus gab dieser Autor auch in seinen späteren Arbeiten (1948) an, wo er einen Viruskomplex, in welchem das Gurkenmosaikvirus die Hauptkomponente darstellte, für die Krankheit verantwortlich machte.

Kovachevsky (1940) hat in Bulgarien die Übertragung des Gurkenmosaikvirus durch Paprikasamen untersucht. Seinen Ergebnissen nach kann es nur selten zur Übertragung dieses Virus durch den Paprikasamen kommen. Unter den diesbezüglich geprüften Sämlingen der Paprikapflanze hat er keine Pflanze mit Virussymptomen beobachtet. In einem seiner Versuche blieb die ganze Nachkommenschaft einer kranken Pflanze bis zur Blüte gesund. In brieflichen Mitteilungen hat Kovachevsky noch einmal seine Resultate bestätigt, wonach er von Samen aus Früchten mit Symptomen der Krankheit, die von mit Tabak- und Gurkenmosaikvirus befallenen Pflanzen stammten, immer nur gesunde Pflanzen erhalten habe.

Unsere eigenen Untersuchungen in Jugoslawien führten zu dem Ergebnis, daß eine Virusübertragung durch den Paprikasamen möglich ist. Aus erkrankten Paprikapflanzen, die aus Samen infizierter Pflanzen erwachsen waren, haben wir das Virus isoliert. Wir untersuchten die Krankheitssymptome, den Kreis seiner Wirtspflanzen wie auch seine antigenen Eigenschaften. Auf Grund der erzielten Resultate folgern wir, daß unser Virusstamm, übertragen durch Paprikasamen, dem Luzernemosaikvirus angehört, das Smith (1957) als „Alfalfa mosaic virus" bezeichnete. Durch das Fehlen der pathogenen Eigenschaften für *Lycopersicum esculentum* und *Solanum tuberosum* nähert sich dieser Stamm sehr den Paprikastämmen (Pepper strain), die dieser Autor im Rahmen der genannten Art beschrieben hat. Dieser Paprikavirusstamm ist in der Literatur auch als *Marmor medicaginis* var. *capsici* bekannt.

Über die Übertragbarkeit dieser Virusart durch den Paprikasamen wurde in den Arbeiten anderer Autoren nichts erwähnt bzw. hatten wir darüber keine Angaben. In unseren Versuchen erwies sich diese Virusart als durch den Samen übertragbar, und zwar zu 1 bis 5 % (durchschnittlich etwa 2 %).

Obwohl dieser Prozentsatz niedrig ist, ist er doch von Bedeutung, da eine geringe Zahl verseuchter Pflanzen genügt, um durch Insekten-Vektoren das Virus stark zu verbreiten.

Wird durch den Samen auch das Gurkenmosaikvirus bei Paprika übertragen? — In unseren Versuchen konnte, ähnlich wie bei Kovachevsky, die Samenübertragung dieses Virus nicht festgestellt werden. Wir betrachten jedoch unsere Resultate nicht als abschließend, da das untersuchte Saatgut, wie wir bereits hervorgehoben haben, nicht ausschließlich von kranken Pflanzen, sondern aus Mischproben von gesunden und kranken Pflanzen stammte. Die Frage der Übertragbarkeit dieser Virusart bleibt wichtig und sollte nach unserer Ansicht Gegenstand weiterer eingehender Untersuchungen sein.

Zusammenfassung

Die Virosen stellen für den Paprikaanbau in einigen Gebieten Jugoslawiens ein sehr wichtiges Problem dar. Im Horgoschgebiet, wo Gewürzpaprika für die industriemäßige Verarbeitung gebaut wird, wurden in einzelnen Beständen bis zu 36 % viruskranker Pflanzen gefunden.

Als die am häufigsten vorkommenden Virosen sind die „Reisigkrankheit", die das Gurkenmosaikvirus hervorruft, und die „Buntblättrigkeit", die durch das Luzernemosaikvirus hervorgerufen wird, festgestellt worden. Die „Reisigkrankheit" der Paprikapflanze hat sich als die wirtschaftlich wichtigere erwiesen, da sie den Fruchtansatz hemmt und den Ertrag erheblich vermindert. Einen noch weit größeren Schaden in den Paprikabeständen verursachen jedoch Mischinfektionen der genannten Viren.

Bei der Untersuchung des Paprikasaatgutes aus normaler Erzeugung wurde festgestellt, daß durch den Samen das Luzernemosaikvirus (alfalfa mosaic virus, pepper strain — nach Smith; Syn. *Marmor medicaginis* var. *capsici)* übertragen wird. Die Übertragung dieses Virus durch den Samen variiert in Grenzen von 1 bis 5 %.

Infolge einer Übertragungsmöglichkeit durch Vektoren ist die wirksamste Bekämpfungsmaßnahme die Erzeugung von gesundem Saatgut. Das Saatgut soll ausschließlich von gesunden Pflanzen und von unverseuchten Bestandesflächen genommen werden, die im Laufe der ganzen Vegetationsperiode unter Kontrolle stehen müßten.

Die jungen, durch den Samen mit Luzernemosaikvirus infizierten Pflanzen weisen schon im Kotyledonenstadium und am ersten Blattpaar Krankheitssymptome auf. Diese frühe Symptomausbildung kann zweckdienlich beim Paprikaanbau zur Kontrolle des Gesundheitszustands der Sämlinge und zu rechtzeitiger Entfernung kranker Pflanzen aus den Beständen ausgenutzt werden.

Im Sämlingsstadium sind alle Vorsichtsmaßnahmen zu beachten, um der mechanischen Verbreitung der Viren vorzubeugen. Die Sämlinge und später auch die erwachsenen Pflanzen sollen durch Bekämpfung der Blattläuse als Vektoren der Paprikavirosen geschützt werden.

Summary

The virus diseases of pepper present a significant problem in the production of pepper in certain regions in Yugoslavia. In some areas in the region of Horgos, where the spice pepper is grown for industrial processing, it has been found that there were up to 36 % of plants affected.

The most common virus diseases were the "broom" shaped pepper, caused by the cucumber mosaic virus and the "motley" spottiness of leaves, caused by the mosaic virus of alfalfa. The "broom" shaped pepper has proved to be the most harmful one, because it inhibits the formation of fruit thus decreasing the yield. A still greater harm is done on account of the complex infection of plants by the above mentioned viruses.

Studying the seeds of pepper from the normal production, we found that they transmitted mosaic virus of alfalfa (Alfalfa mosaic virus, Pepper strain — after Smith; Syn.: *Marmor medicaginis* var. *capsici).* The transmission of this virus varies to a certain degree (1 to 5 % with a close average of about 2 %). Since there are vector insects of this virus, this percentage is very significant in spreading the disease in nature.

On account of the possibility of spreading the disease in such a manner, there is a need for controlling the virus by producing healthy seeds. The seeds should carefully be selected from healthy plants, from non infected areas and they should be checked during the whole vegetation period.

The young seedlings infected by the mosaic virus of alfalfa through seeds, show already symptoms of the disease in the phase of cotyledons and on the first pair of leaves. Such an early appearence of symptoms may be used in pepper production for the control of healthy state of seedlings, and timely elimination of all diseased young plants which may serve as a source of infection.

In the manipulation of seedling production, precautionary measures should be taken so as to avoid mechanical spreading of the virus on seedlings. The seedlings as well as the more mature plants should be protected by spraying against leaf aphids, which are vectors of the pepper virus.

Literaturverzeichnis

Anderson, C. W., and M. K. Corbett, 1957: Virus diseases of peppers in Central Florida; survey results 1955. Plant dis. Reptr. **41**, 143—147.

Gualaccini, F., 1956: Trasmissibilita del virus producente il mosaico del peperone, mediante la cuscuta, e prove di identificazione di esso. Boll. Staz. Patologia Veget. **13**, 79—101.

Köhler, E., und M. Klinkowski, 1954: Viruskrankheiten. In Sorauer, Handb. Pflzkrankh. Bd. 2, 6. Aufl., 1. Lfg. Parey, Berlin u. Hamburg.

Kovachevsky, I. Ch., 1940: Die Reisigkrankheit der Paprikapflanze (*Capsicum annuum*). Z. Pflanzenkrankh. u. Pflanzenschutz **50**, 298—308.

— —, 1942: Die Buntblättrigkeit der Paprikapflanze (*Capsicum annuum*) (Medicago virus 2 K. Smith var. *typicum* Black u. Price). Z. Pflanzenkrankh. u. Pflanzenschutz **52**, 533—540.

— —, 1954: Die Stolburkrankheit der Solanaceen. Nachrichtenbl. Dtsch. Pflzschutzd. n. F. **9**, 161—166.

Limasset, P., 1955: L'identification sérologique des virus des plantes. Rev. path. gén. comparée **667**, 609—625.

— —, et Augier de Montgremier, 1948: Application de la microséroréaction de Jermoljev et Hruska au dosage des virus des plantes. Ann. inst. Pasteur **712**, 251.

Panjan, M., 1950: Ispitivanje Stolbura Solanacea i način suzbijanja. Plant Prot. **2**, 49—58.

Simons, J. N., 1957 a: Effects of insecticides and physical barriers on field spread of pepper veinbanding mosaic virus. Phytopathology **47**, 139—145.

— —, 1957 b: Three strains of cucumber mosaic virus affecting bell pepper in the Everglades area of South Florida. Phytopathology **47**, 145—150.

— —, 1958: Titers of three nonpersistent aphid-borneviruses affecting pepper in South Florida. Phytopathology **48**, 265—268.

Smith, M. K., 1957: A textbook of plant virus diseases. London, 2. Aufl.

Szirmai, J., 1937/40: A füszerpaprika leromlását megíndító, újhitüsegnek nevezett virusbetegségröl. Növényegészségügyi Évkönyv **1**, 109—133.

— —, 1948: Virusbetegségek terjedése a vetömag útján. Különleny. az Agrártud. Egyet. Kert. — és Szölögazd. tud. Kar. Közl **12**, évfolyamából, 1—18.

— —, 1949: Kísérletek egészséges vetömag nyerésére virusbeteg növenyekröl. Növényvédelmi évkönyv **15**, 215—227.

From Department of Botany, D.S.B. Government College, Naini Tal (India)

Erysiphe polygoni DC. on *Homalocladium platycladum* from India

By

S. C. Gupta and K. S. Bhargava[1])

With 7 figures

Four plants of ribbon-bush, *Homalocladium platycladum* (F. Muell.) Bailey (syn. *Muehlenbeckia platyclados* Meisson) were brought from Agra to Naini Tal in 1955. Two of these plants developed a large number of leaves and were seen heavily infected with powdery mildew in the spring of 1956. Since then the leaves always get powdery mildew on them. The infection was never noted on this host at Agra.

The only available information about the powdery mildew on *Homalocladium platycladum* is from U. S. A. reported by Dimock (1943), who identified it as "probably *Erysiphe polygoni*". The powdery mildew on this host is now collected from India and described.

Only the leaves of *Homalocladium* are attacked by the mildew and the flattened stem (phylloclade) does not show any signs of infection (Fig. 1). In the beginning the leaves show white, small, powdery spots on the upper surface. These patches spread and soon cover the entire surface. Later on the infection spreads to the lower surface also. During rainy season, when the infection is heavy, a thick powdery layer of oidia is formed and the infected leaves show yellowing and distortion. Further growth of the leaves stops and they do not reach the normal size. Upper surface always shows heavier infection. A large number of dark brown perithecia also develop at a later stage.

The mycelium is hyaline, thin, branched and persistent. Haustoria mostly develop singly in the epidermal cells of the host and are uninucleate and globular (Fig. 4). Conidiophores arise vertically from the leaf surface. They are mostly three celled (Fig. 2) formed of stipe, generative and maturing cells. Conidia are thin-walled, smooth, colourless, ovate or barrel shaped and 10—16 μ by 30—45 μ in size. They readily germinate at room temperature (20 °C) forming a single germ tube laterally at one end (Fig. 3).

Perithecia, dark brown in colour, are formed in large numbers scattered all over the leaf surface and are 84—126 μ (average 112 μ) in size. Append-

[1]) Now at University of Gorakhpur, Gorakhpur, U. P.

ages are brown, many and more or less interwoven with the mycelium. Each perithecium has got 4 asci (Figs. 6 and 7) which are slightly stalked, 25 to 33 μ in diameter and each with four ascospores (Fig. 5). Each ascospore is 10—12.5 $\times$ 12—20 μ in size.

The description of the parasite and the measurements of conidia, ascospores, asci and perithecia resemble the description of *Erysiphe polygoni* DC. given by Blumer (1933). Another characteristic feature in the parasite is the shape of haustoria and conidiophores which are similar to that of *Erysiphe polygoni* (cf. Fig. 2, A_3 of Blumer, 1933 and Plate 1, B II of Yarwood, 1957).

The authors are grateful to Drs. Kenneth F. Baker and C. E. Yarwood of University of California for their kind suggestions.

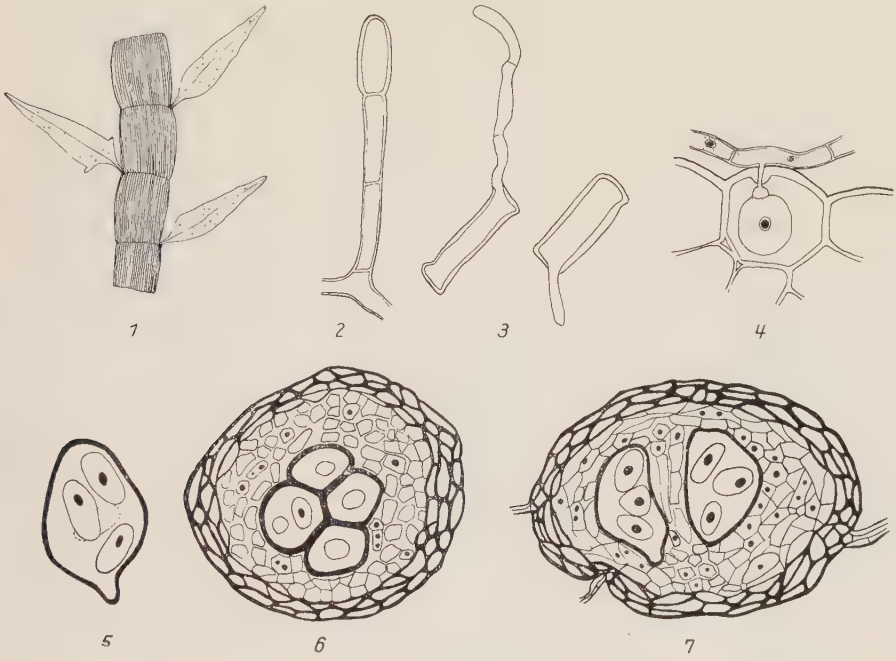

Fig. 1. A portion of *Homalocladium* plant showing infection of the leaves.
Fig. 2. A single conidiophore. $\times$ 375.
Fig. 3. Germinating conidia. $\times$ 375.
Fig. 4. A haustorium in the epidermal cell of the host. $\times$ 375.
Fig. 5. A single ascus with four ascospores. $\times$ 375.
Fig. 6 and 7. Transversal section and vertical section of the perithecia. $\times$ 330.

Summary

A powdery mildew on *Homalocladium platycladum* has been described for the first time from India and identified as *Erysiphe polygoni* DC.

Zusammenfassung

Ein echter Mehltaupilz ist in Indien zum erstenmal auf *Homalocladium platycladum* gefunden und beschrieben worden. Er läßt sich als *Erysiphe polygoni* DC. bestimmen.

Literaturverzeichnis

Blumer, S., 1933: Die Erysiphaceen Mitteleuropas. Beitr. Krypt. Flora d. Schweiz 7 (1), 1—483.

Dimock, A. W., 1943: Powdery mildew on ribbon-bush (*Homalocladium platycladum* Bailey). Phytopathology **33**, 745—746.

Yarwood, C. E., 1957: Powdery mildews. Bot. Rev. **23**, 235—301.

Kurze Mitteilung

Aus der Biologischen Zentralanstalt der Deutschen Akademie der Landwirtschaftswissenschaften zu Berlin, Institut für Phytopathologie Aschersleben

Die Gelbnetzkrankheit der Forsythie

Von

K. Schmelzer und H. O. Schmidt

Mit 2 Abbildungen

Im Jahre 1956 beobachtete einer von uns (Schmidt) in einem Garten des Dorfes Wiederau, Kreis Rochlitz (Sachsen), einen Strauch von *Forsythia intermedia* Zabel mit auffälligen Blattveränderungen, die dieser Pflanze gleichsam einen höheren Zierwert verliehen. Die Blätter wiesen eine leuchtend gelbe netzartige Zeichnung auf, die dem Verlauf der Adern folgte (Abb. 1). Kräuselungen und andere Deformationen waren damit nicht verbunden. Von diesem Strauch wurden im gleichen Jahre aus unverholzten noch nicht einjährigen Trieben Stecklinge gewonnen und in Aschersleben kultiviert. Zwei Jahre später

Abb. 1. *Forsythia intermedia*, links: gelbnetzkranke, rechts: gesunde Blätter gleicher Entwicklungsstadien

kamen Pfropfversuche zur Durchführung. Zu Beginn der Vegetationsperiode 1959 war festzustellen, daß das Gelbnetz der Forsythie infektiöser Natur ist. Eine junge, augenscheinlich vor Beginn der Versuche gesunde Pflanze von *Forsythia intermedia* wies gelbe Adern an Blättern eines Zweiges auf, in dessen unmittelbarer Nachbarschaft eine Knospe eines kranken Stecklings eingesetzt worden war. Auch das reziproke Experiment war erfolgreich: Ein Trieb einer gesunden Pflanze wurde durch Ablaktion auf eine kranke Unterlage gepfropft und zeigte zu Beginn der neuen Vegetationsperiode Gelbnetzsymptome. Sogar in wesentlich kürzerer Zeit gelang die Pfropfübertragung: Eine im März 1959 unmittelbar vor dem Austrieb mit krankem Material okulierte Pflanze zeigte anfangs keine Symptome. Durch Rückschnitt wurde im Mai ein Neuaustrieb erzwungen. Innerhalb weniger Tage zeigte dieser das Gelbnetz an einigen Blättern ober- und unterhalb der eingesetzten Knospe, obgleich sich diese selbst nicht entwickelte.

Abb. 2. *Chenopodium quinoa* und *Cucumis sativus* elf Tage nach mechanischer Beimpfung mit Preßsaft aus Knospen gelbnetzkranker (links) und gesunder (rechts) *Forsythia intermedia*

Die 1956 hergestellten Stecklinge der kranken Forsythie wurden daraufhin durch Abreibung von jeweils 15 kurz vor der Entfaltung stehender Knospen, die zusammen mit je 0,5 ml 1/15 molarem Phosphatpuffer von pH 6,8 zermörsert worden waren, auf Virusgehalt getestet.

Alle sechs Stecklinge verursachten an sämtlichen abgeriebenen Pflanzen von *Chenopodium quinoa* Willd. und *Cucumis sativus* L. Virussymptome. Bereits nach sechs Tagen konnten Primärsymptome festgestellt werden. Sie bestanden aus chlorotischen Flecken, die bei beiden Pflanzenarten zum Teil schwach nekrotisch wurden. Die beimpften Blätter von *Chenopodium quinoa* krümmten sich frühzeitig nach unten, auch die Stengel verbogen sich, und die Pflanzen blieben im Wuchs zurück (Abb. 2, oben). Ein anfangs mit leichten Nekrosen und Deformationen verbundenes Mosaik wurde an den Folgeblättern sichtbar. Auch bei der Gurke kam es zu einem Mosaik mit Kräuselungen und Wuchsdepressionen (Abb. 2, unten). Später wurde das Mosaik meist etwas schwächer und es zeigten sich nekrotische Flecke. Junge unentwickelte Spitzenblätter starben ab. Zur Kontrolle in der gleichen Weise durchgeführte Verimpfungen von Knospen gesunder Forsythien verliefen stets negativ.

Verschiedene Pflanzenarten wurden mit Preßsaft kranker Gurken abgerieben. Bisher erwiesen sich zwanzig Arten auf Grund ihrer Symptome bzw. des positiv verlaufenen Rücktestes als anfällig. Sie gehören folgenden elf Pflanzenfamilien an: Aizoaceen, Boraginaceen, Chenopodiaceen, Compositen, Cruciferen, Cucurbitaceen, Dipsacaceen, Hydrophyllaceen, Leguminosen, Scrophulariaceen und Solanaceen. Voraussichtlich umfaßt der Wirtskreis des isolierten Virus wesentlich mehr Pflanzenarten als bisher gefunden werden konnten. Zur Zeit ist noch kein sicheres Urteil darüber abzugeben, ob das Virus mit einem der bereits bekannten identisch ist. Auf Grund der systemisch-nekrotischen Anfälligkeit von *Phaseolus vulgaris* und *Vigna sinensis* und anderer Merkmale ist es vom normalen Gurkenmosaik-Virus verschieden. Abreibungen der Blätter von *Ligustrum vulgare* L., die die Symptome der durch Baur (1906, 1907) beschriebenen infektiösen Chlorose aufwiesen, führten an *Cucumis sativus* und *Chenopodium quinoa* zu keinen Erkrankungen. Bisher ist noch nicht festgestellt worden, auf welche Weise die Gelbnetzkrankheit unter natürlichen Bedingungen verbreitet wird und ob das mechanisch übertragbare Virus das einzige darstellt, das in den gelbnetzkranken Forsythien vorhanden ist. Unseres Wissens ist das Gelbnetz der Forsythie die erste an dieser Pflanze beobachtete Viruskrankheit.

Literaturverzeichnis

Baur, E., 1906: Weitere Mitteilungen über die infektiöse Chlorose und über einige analoge Erscheinungen bei *Ligustrum* und *Laburnum*. Ber. Dtsch. Bot. Ges. **24**, 416—428.

— —, 1907: Über infektiöse Chlorosen bei *Ligustrum, Laburnum, Fraxinus, Sorbus* und *Ptelea*. Ber. Dtsch. Bot. Ges. **25**, 410—413.

Besprechungen

Ceruti-Scurti, J., Le malattie delle piante, Parte Prima: Malattie da virus e da parassiti vegetali. Verlag Loescher, Torino. 1958. L. 3000,—.

Einführend gibt die Autorin in knapper, klarer Form einen Überblick über die wesentlichsten biologischen Vorgänge bei der pflanzlichen Infektion. In kurzen Zügen werden auch die phytopathologischen Organisationen Italiens und die wirtschaftliche Bedeutung der Pflanzenkrankheiten umschrieben. Ferner stellt die Autorin die wichtigsten Bekämpfungsmethoden der Pflanzenkrankheiten dar und führt den Agronomen und Studenten — für welche das Buch hauptsächlich gedacht ist — in die Methodik zum Studium der pflanzlichen Parasiten ein.

Im speziellen Teil werden die für italienische Verhältnisse wichtigen Krankheiten der land- und forstwirtschaftlichen und gärtnerischen Kulturpflanzen dargestellt. Es wird vor allem großer Wert auf eine genaue Beschreibung der Symptomatik gelegt. Den Beschreibungen sind beachtenswerte Zeichnungen, Photographien wie auch einige farbige Tafeln beigefügt. Diese reiche Illustration erleichtert dem Praktiker das Bestimmen und ist um so überraschender bei dem verhältnismäßig bescheidenen Preise. Dem Kapitel über die Mykosen wurde ein einfacher analytischer Schlüssel beigefügt, welcher das Bestimmen der Klassen bis zu den Gattungen erleichtert.

Ein sehr erfreuliches Buch, das großen Nutzen stiften wird. GÄUMANN, Zürich

Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem, **Heft 92:**

Steudel, W., und P. Blaesen, Bericht über die in den Jahren 1955 und 1956 durchgeführten Gemeinschaftsuntersuchungen zum Auf- bzw. Ausbau eines Blattlauswarndienstes im Rübenbau. 1958. 39 Seiten mit 11 Abbildungen und zahlreichen Tabellen. Broschiert DM 4,50. Im Buchhandel zu beziehen durch den Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg.

Die Verff. legen die Ergebnisse einer Gemeinschaftsarbeit vor, an der 12 Pflanzenschutzämter, 2 Institute der Biologischen Bundesanstalt, das Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung Rosenhof und die Arbeitsgemeinschaft „Vergilbung" in Worms beteiligt waren. Die Ergebnisse der gleichmäßig über das Bundesgebiet verteilten Versuchsstellen über Überwinterung und Gradationsverlauf von *Myzodes persicae* und *Doralis fabae,* über das Auftreten der Vergilbungskrankheit der Rüben sind in Tabellen, graphischen Darstellungen und Karten zusammengefaßt. Die Frühentwicklung der Vektoren und ihr Erscheinen an den Sommerwirten entspricht dem Gang des Frühlings im Bundesgebiet. Beginn und Maximum des sommerlichen Blattlausfluges folgen diesem Trend, der die besondere Virusgefährdung von Süd-, West- und Nordwestdeutschland verständlich macht. Die Koinzidenz von Massenflug und Schluß des Rübenbestandes entscheidet oft über den Virusbefall. Die Gefährdung des Rübenbaues durch in Mieten überwinternde Blattläuse nimmt, wie nun eindeutig bestätigt ist, von West nach Ost ab. Gradationen von *Doralis fabae* fanden sich im ganzen Bundesgebiet, solche von *Myzodes persicae* nur in Nordrhein-Westfalen und im oberen Rheingraben, vor allem im ersten Gebiet ist diese Art entscheidend an der Vergilbungsausbreitung beteiligt; letztere hat ihr Maximum in dem Raum zwischen Köln und Münster in beiden Untersuchungsjahren, während die im Jahre 1956 großräumige Massenvermehrung von *Doralis fabae* keinen entsprechenden allgemeinen Vergilbungsbefall nach sich zog.

So stellt vorliegender Bericht einen sehr wertvollen Beitrag zur Klärung wichtiger Fragen der Virusausbreitung dar. Die mehrjährige Fortführung der hier begonnenen Untersuchungen möge sich bald zu einem geschlossenen Bild runden, welches der Verf. abschließend diskutieren wird. FUCHS, Göttingen

Pflanzenpathogene Bakterien

Eine Einführung mit Hinweisen auf einschlägige bakteriologische und serologische Arbeitsmethoden

Von Dr. C. STAPP

1958. 260 Seiten mit 100 Abbildungen. Kart. DM 29,—; Ganzleinen DM 32,—

Pflanzenpathogene Bakterien, deren Existenz noch vor fünfzig Jahren angezweifelt wurde, haben heute eine erhebliche Bedeutung erlangt. Das Buch enthält in seinem allgemeinen Teil eine Darstellung der bakteriologischen Technik, deren Beherrschung und richtige Anwendung die unbedingte Voraussetzung für ein erfolgreiches Arbeiten ist. Der spezielle Teil bringt dann in alphabetischer Ordnung eine Auswahl von 24 Bakterienarten, die für den mitteleuropäischen Raum von besonderer Bedeutung sind.

„Die lebendige Art der Darstellung, die sich mit allen Fragen, nicht zuletzt auch dem unvermeidlichen und so lästigen Nomenklaturproblem, immer wieder kritisch auseinandersetzt, wird von allen Benutzern des Buches, besonders aber von den Fachkollegen begrüßt werden. Sie vermittelt einen klaren Überblick über das, was noch umstritten ist, und läßt am besten erkennen, welche Fortschritte erzielt sind und wie vieles und was vordringlich noch weiterer intensiver Bearbeitung harrt." *Angewandte Botanik*

OBSTBAU

Grundlagen, Anbau und Betrieb

Von Prof. Dr. F. HILKENBÄUMER

3., neubearbeitete Auflage. 367 Seiten mit 331 Abbildungen auf Tafeln und im Text.

1 farbige Tafel. Kart. DM 25,—; Ganzleinen DM 28,—

In diesem bewährten und bekannten Werk wird das Gesamtgebiet des Obstbaues in einer glücklichen Verbindung von bestem handwerklichem Können und gründlichster Wissenschaftlichkeit — unter Zugrundlegung der Erfahrungen in den Obstbau treibenden Ländern der Welt — lückenlos behandelt. Die wissenschaftlichen Forschungsergebnisse stehen in Beziehung zu ihrer praktischen Nutzanwendung. Im einzelnen hervorgehoben sind die besondere Bedeutung der Wirkstoffe, die mineralische Ernährung, der Pflanzenschutz sowie die betriebswirtschaftlichen Probleme.

„Die textliche und zeichnerische Darstellung des Buches hat etwas Suggestives, Eindringliches und eine Sicherheit, deren Wirkung sich wohl kaum jemand entziehen kann. Zweifellos ist der HILKENBÄUMER deshalb als ein Fachbuch von Weltformat anzusprechen, das im In- und Ausland ein weltweites Echo finden wird." *Gartenwelt*

VERLAG PAUL PAREY / BERLIN UND HAMBURG

Krankheiten und Schädlinge der Kulturpflanzen

und ihre Bekämpfung

Für Praxis und Studium

Von Prof. Dr. H. BRAUN und Dr. E. RIEHM

8., neubearbeitete Auflage. 1957. 376 Seiten mit 346 Abbildungen.

Kartoniert DM 27,60; Ganzleinen DM 29,80

Dieses Werk hat durch seine in rascher Folge erschienenen Neuauflagen den neuzeitlichen Erkenntnissen und Erfahrungen auf dem Gebiet des Pflanzenschutzes und den Fortschritten in den Bekämpfungsmethoden in besonderer Weise Rechnung tragen können.

„In vorzüglicher Ausstattung, mit reicherer Bebilderung und vermehrtem, auf den neuesten Stand gebrachten Text präsentiert sich die 8. Auflage des bereits zum international geachteten Standardwerk gewordenen Buches von BRAUN-RIEHM. In bewährter Form gliedert sich das Werk in einen allgemeinen und einen speziellen Teil. Im erstgenannten wird alles Wesentliche über Pflanzenkrankheiten, ihre Erreger und die geeigneten Abwehrmaßnahmen gesagt. Der spezielle Teil enthält eine Darstellung der wichtigeren Krankheiten und Schädlinge unserer Kulturpflanzen. Der BRAUN-RIEHM wird infolge seiner in dieser Auflage erreichten Vervollkommnung weitere Freunde aus allen interessierten Kreisen zu den bisherigen hinzugewinnen."

Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene

---

Farbtafelatlas der Krankheiten und Schädlinge an landwirtschaftlichen Kulturpflanzen

Von E. GRAM, P. BOVIEN, C. STAPEL

Herausgegeben vom Landwirtschaftlichen Informationsdienst, Kopenhagen

1956. 128 Seiten mit 720 mehrfarbigen Abbildungen auf 112 Tafeln.

Bilderklärungen dreisprachig. Sachregister viersprachig. Ganzleinen DM 19,50

Hier liegt erstmals eine so umfangreiche Zusammenstellung von mehrfarbigen Abbildungen kranker und von Schädlingen befallener landwirtschaftlicher Kulturpflanzen in Ganz- und Teildarstellung sowie der Schädlinge selbst in einer derart wirklichkeitsnahen und naturgetreuen Wiedergabe vor. Jeder Bildtafel gegenübergestellt ist eine kurze Erklärung in dänischer, englischer und deutscher Sprache; das Sachregister am Ende des Buches bringt außerdem auch noch die lateinischen Bezeichnungen.

„Die vorzügliche Farbgestaltung der Bilder, die erschöpfende und gründliche Darstellung machen diesen Atlas zu einem ausgezeichneten Hilfsmittel für den Pflanzenschutz der modernen Landwirtschaft."

Deutsche Landwirtschaftliche Presse

VERLAG PAUL PAREY / BERLIN UND HAMBURG